

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN Y DEL
PAPEL ONCOGÉNICO DE LISIL OXIDASA
(LOX) EN LOS TUMORES DE EWING.**

Memoria presentada por **Noelia Agra Andrieu**, licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de Tesis: Dr. Fco. Javier Alonso García de la Rosa.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM
Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III
Madrid, 2010

D. Francisco Javier Alonso García de la Rosa, Doctor en Biología e Investigador Titular del ISCIII, Unidad de Tumores Sólidos Infantiles del Centro Nacional de Microbiología.

CERTIFICA:

Que Noelia Agra Andrieu, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título:

“Estudio de la regulación y del papel oncogénico de Lisil Oxidasa (LOX) en los tumores de Ewing”

el cual considero satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, expido el siguiente certificado en Madrid a 21 de Mayo de 2010.

Fdo. Fco. Javier Alonso García de la Rosa
Investigador del ISCIII

Fdo. Miguel Quintanilla Avila
Profesor Honorario del Departamento de Bioquímica

A mis padres
A mis hermanas
A Iván

AGRADECIMIENTOS

Cuando hace cuatro años me embarqué en esta aventura, no me imaginaba lo realmente ardua que podía llegar a ser, pero si me diesen la opción de retroceder en el tiempo, me volvería a embarcar en ella por que toda la gente que he encontrado en el camino ha hecho que merezca la pena sin dudar. Aparte del conocimiento adquirido durante la realización de esta tesis, he reafirmado mi comprensión de las palabras compromiso, desafío, empeño, tesón, paciencia, y sobre todo, infinita ilusión. Este proyecto ha sido posible gracias a todas las personas que me han brindado su apoyo, aunque seguramente no estarán todas las que son.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Ángel Pestaña por darme la oportunidad de incorporarme a su laboratorio y por todo el apoyo recibido para llevar a fin este trabajo. Al Dr. Francisco Javier Alonso, por poner a mi disposición todos sus conocimientos, y por su labor de dirección y supervisión.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Instituto de Salud Carlos III, cuyas infraestructuras han permitido desarrollar estos estudios, y al personal de todos sus servicios, tanto administrativos como de apoyo a la investigación, por facilitar en gran medida el trabajo diario. Al Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-07586), el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2007-62101 y SAF2009-10158), el Instituto de Salud Carlos III (UIPY 031/09), la Fundación María Francisca de Roviralta, la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer y la Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid por la financiación aportada o las becas concedidas.

A todos los compañeros con los que empecé en el labo 1.7, que me pusieron las cosas tan fáciles, y con los que compartí tantos desayunos y comidas, confesiones, risas, consuelo, y sobre todo mucho cariño. A Isa por la alegría que me transmitía cuando llegaba siempre con su sonrisa y a Jaime porque me hacía olvidarme de los problemas con su risa contagiosa. Quiero agradecer en especial a Eva su apoyo incondicional y sus palabras de ánimo, y sobre todo a Angelo, que es el que mejor me ha entendido estos últimos meses, y me ha tendido la mano en los momentos más difíciles. Me he sentido muy arropada y querida por vosotros. Y no me puedo olvidar de Miriam y de Amada,

muchas gracias por devolverme las fuerzas para seguir y por los buenos momentos que hemos compartido. Aunque nuestros caminos se hayan separado, siempre seguiréis siendo “mis amigos”.

También le quiero dar las gracias a los integrantes del labo 1.9, que me acogieron y me acompañaron en tantas comidas, y compartieron conmigo sus bromas, sus risas y su cariño. Y a todos mis compañeros del ISCIII, Isa, Ana, Pilar, Rafa, Nacho, Ana y en especial a Eva, Rebe, Isa y María, que han estado a mi lado en la recta final y que me han hecho sentir tan a gusto. Echaré mucho de menos compartir nuestras confidencias en la sobremesa.

Gracias a mis padres, por apoyarme siempre en todas mis decisiones y por enseñarme a luchar por lo que quería. En gran medida esta tesis es mérito vuestro. A mis hermanas, porque siempre estáis conmigo en los buenos y malos momentos, y porque nadie como vosotras para darme un abrazo cuando lo necesito. Sobre todo me quedo con las risas que compartimos. Gracias a la familia de Iván por el interés que han mostrado siempre y por cuidarme tan bien. Y un agradecimiento muy especial a alguien que me ha ayudado tanto desde ahí arriba.

A Iván, porque nadie como tú me comprende, me apoya, y sobre todo, me hace tan feliz. Mil gracias por tu infinita paciencia, por tus buenas maneras y por tu inmenso cariño. Hemos pasado juntos los mejores y peores momentos y sabes que tendrás en mí un hombro en el que apoyarte, igual que el que yo he encontrado en ti siempre. Qué bonito se ve el mundo cuando lo miro desde tus ojos.

A todos vosotros, mi más sincero agradecimiento.

RESUMEN: Los tumores de la familia de Ewing se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas entre el gen EWS y algunos miembros de la familia de factores de transcripción ETS, siendo FLI1 el más frecuentemente implicado en la translocación. La proteína de fusión EWS/FLI1 es un factor de transcripción aberrante con propiedades oncogénicas y esencial para el desarrollo de los tumores de Ewing. Nuestro grupo ha demostrado que EWS/FLI1 induce la expresión de los genes CCK y NR0B1, y que reprime la expresión del gen LOX (lisil oxidasa). Profundizamos en el mecanismo de regulación de LOX por parte de EWS/FLI1 y estudiamos su papel en los tumores de Ewing. Para ello desarrollamos sistemas inducibles de expresión de LOX, así como de su región propéptido (PP-LOX) y de la enzima madura (LOX enz). De esta manera demostramos que la inducción de la región propéptido de LOX en líneas celulares de Ewing bloquea el ciclo celular, disminuye la proliferación celular y la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeprimidos, mientras que observamos los efectos contrarios al sobreexpresar LOX enzima. Nuestros resultados indican que en los tumores de Ewing, la región propéptido de LOX actúa como supresor tumoral y que por tanto su expresión o administración podría ser una herramienta para el tratamiento de este tumor pediátrico tan agresivo.

SUMMARY: Ewing family of tumors are characterized by the presence of traslocations between the EWS gen and some members of the ETS family of transcription factors, being FLI1 the most frequently implicated in the traslocation. The fusion protein EWS/FLI1 is an aberrant transcription factor with oncogenic properties and essential for Ewing tumor development. Our group has demonstrated that EWS/FLI1 induces CCK and NR0B1 expression and represses LOX expression. We then focus in the regulation mechanism of LOX by EWS/FLI1, and in its role in Ewing tumors. We use inducible models to express LOX, the propeptide region and the mature enzyme expression. In this way we demonstrate that the induction of the propeptide region of LOX in Ewing cell lines causes growth arrest, reduces cellular proliferation and the transforming capability to growth in immunodeficient mice. The expression of LOX enzyme has the contrary effect. Our data indicates that the propeptide region of LOX acts as a tumor suppressor in Ewing tumors, so its expression or administration could be a new approach in the treatment of this aggressive pediatric tumor.

Índice

1. Introducción.....	17
1.1 Los Tumores de la familia Ewing.....	19
1.1.1 Características histológicas, epidemiología y origen celular de los tumores de la familia Ewing.....	19
1.1.2 Características clínicas y estrategias terapéuticas.....	21
1.1.3 Características moleculares	23
1.2 Propiedades oncogénicas de las proteínas de fusión EWS/ETS	26
1.3 Genes regulados por las proteínas quiméricas EWS/ETS.....	28
1.4 Características de la enzima Lisil Oxidasa (LOX).....	30
1.4.1 Organización génica de LOX y estructura proteica.....	30
1.4.2 Actividad catalítica de LOX	32
1.4.3 LOX como supresor tumoral	34
1.4.4 LOX como promotor de metástasis	35
1.4.5 LOX en fisiología y patología humana.....	36
2. Objetivos	39
3. Materiales y Métodos.....	43
3.1 Material Biológico	45
3.1.1 Líneas celulares	45
3.1.2 Muestras tumorales.....	46
3.2 Plásmidos	46
3.3 Establecimiento de líneas celulares de Ewing con expresión inducible de shARN.....	47
3.4 Establecimiento de líneas celulares de Ewing con expresión ectópica e inducible de LOX, PP-LOX y LOXenz	47
3.5 Estudio del mecanismo de regulación de LOX en las células de Ewing	49
3.5.1 Estudio del efecto de suramin, IGF-1 y FGF-2 sobre la expresión de LOX en las células de Ewing.....	49
3.6 Estudios celulares	49
3.6.1 Estudios de proliferación celular	49
3.6.1.1 Cuantificación del tiempo de duplicación	49
3.6.1.2 Cuantificación del crecimiento celular mediante tinción con cristal violeta ..	50
3.6.1.3 Ensayo de viabilidad celular con <i>CellTiter-Fluor</i>	50
3.6.2 Estudios de citometría de flujo	50
3.6.3 Estudios de migración a través de membrana.....	51
3.6.4 Formación de focos de crecimiento en agar blando	51
3.7 Estudios <i>in vivo</i> . Formación de tumores en ratones.....	52
3.8 Cuantificación de la actividad enzimática con Amplex Red	53
3.9 Estudios de expresión génica	53
3.9.1 RT-PCR cuantitativa en tiempo real.....	53
3.9.2 Extracción de proteína nuclear y total	55
3.9.3 Inmunoprecipitación.....	56
3.9.4 <i>Western Blot</i>	56
3.9.5 Inmunofluorescencia	57
3.10 Análisis estadístico	58
4. Resultados	59
4.1 Lisil oxidasa (LOX) es un gen diana de la oncoproteína EWS/FLI1	61
4.1.1 Establecimiento de modelos celulares de expresión inducible de ARN de interferencia de EWS/FLI1 en células de Ewing.....	61
4.1.2 EWS/FLI1 reprime la expresión de LOX.....	65
4.2 Mecanismos de regulación de LOX en las células de Ewing	69
4.2.1 La regulación de LOX por parte de EWS/FLI1 es tardía	69
4.2.2 Implicación de las vías de señalización autocrina de IGF-1 y FGF-2 en la regulación de LOX en las células de Ewing.....	69
4.3 Papel oncogénico de LOX en los tumores de la familia Ewing.....	72
4.3.1 Establecimiento de modelos celulares de expresión inducible de LOX, PP-LOX y LOXenz en células de Ewing	72

4.3.2 Localización subcelular de LOX, LOXenz y PP-LOX	75
4.3.3 La expresión de LOX y PP-LOX inhibe la proliferación de las células de Ewing A673, mientras que LOXenz la aumenta.....	78
4.3.4 Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre el ciclo celular.....	84
4.3.5 La expresión de LOX y PP-LOX disminuye la migración de las células de Ewing A673, mientras que LOXenz la aumenta.....	85
4.3.6 Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz en la formación de focos de crecimiento en agar blando.....	86
4.3.7 La expresión de PP-LOX inhibe la formación de tumores <i>in vivo</i>	88
4.4 Mecanismos de acción de LOX	89
4.4.1 Efecto de la expresión de LOX en la vía de señalización PI3K/AKT y ERK1/2 MAPK en las células de Ewing.....	89
5. Discusión	93
6. Conclusiones	105
7. Bibliografía	109

Abreviaturas

PNET	Tumores neuroectodérmicos primitivos
SE	Sarcoma de Ewing
NB	Neuroblastoma
OS	Osteosarcoma
Ca	Carcinoma
ACa	Adenocarcinoma
LPA	Leucemia promielocítica aguda
NMA-/+	Amplificación negativa/positiva del gen N-myc
DBD	Dominio de unión a ADN
RGG	Región rica en arginina-glicina-glicina
RRM	Motivo de reconocimiento de ARN
HLH	Dominio de unión de proteína tipo hélice-lazo-hélice
shARN	ARNs pequeños en forma de horquilla
Dox	Doxiciclina
aa	aminoácido
PCRq	PCR cuantitativa
UPL	Sonda Taqman, Universal Probe Library, Roche
vs	versus
nº	número

1. Introducción

1.1. Los tumores de la familia Ewing.

1.1.1. Características histológicas, epidemiología y origen celular de los tumores de la familia Ewing.

El sarcoma de Ewing y los tumores neuroectodérmicos primitivos fueron descritos a principios del siglo XX como entidades clinico-patológicas diferentes. En 1918, el Dr. Stout describió un tumor en el nervio cubital con características de sarcoma, pero compuesto por células pequeñas y redondas, que posteriormente denominó tumor neuroectodérmico primitivo (Stout, 1918). En los años 20, el Dr. Ewing describió varios casos de tumores indiferenciados en la diáfisis de huesos largos con alta incidencia de metástasis (Ewing, 1921). Debido a las manifestaciones comunes de ambas patologías, comenzó a hablarse en años posteriores de una entidad única con expresión fenotípica variable. Años más tarde, en 1979, Askin comunicó la existencia de un grupo de neoplasias indiferenciadas, formadas por células redondas de localización toracopulmonar y con rasgos histológicos semejantes al sarcoma de Ewing, por lo que éste tipo de neoplasias pasó a formar parte también de los tumores de la familia de Ewing (Askin et al., 1979).

En 1983, Aurias y colaboradores detectaron la presencia de unas translocaciones cromosómicas características de los tumores de la familia Ewing (Aurias et al., 1984; Delattre et al., 1994; Turc-Carel et al., 1983). Esta alteración cromosómica, que veremos en detalle en el apartado de características moleculares, y que da lugar a proteínas de fusión con propiedades oncogénicas (EWS/FLI1, EWS/ERG, etc.), está considerada el primer evento mutacional que desencadena los tumores de Ewing.

Los tumores de la familia Ewing aparecen como masas destructivas asociadas a hueso (especialmente en pelvis (31%), fémur (20%) y fibula y tibia (11%)) (Grier, 1997), aunque en el 15% de los pacientes se encuentran en tejidos blandos sin aparente asociación a tejido óseo. (Arvand et al., 2001). En el 15-30% de los casos, los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico, localizadas principalmente en pulmón (50%), huesos (25%) y médula ósea (25%). En general, estos tumores afectan a jóvenes adultos en su primera y segunda década de vida, tratándose de la segunda patología tumoral ósea mas frecuente en la población infantil y adolescente, tras el sarcoma osteogénico (Triche, 1988). Presenta una incidencia de 3 casos por millón en individuos menores de 15 años, y es ligeramente más frecuente en varones que en mujeres (ratio 3:2) (Paulussen et al., 2001) y en la población caucásica frente a la población asiática o africana (72,5% frente a 27,5%) (Stiller and Parkin, 1996; Zucman-Rossi et al., 1997).

A pesar de los avances en la comprensión de las bases genéticas de los tumores de la familia Ewing, la naturaleza de la célula precursora sigue siendo hoy en día un tema controvertido. En 1921, el Dr. Ewing sugirió un origen endotelial (Ewing, 1921), pero desde entonces se han propuesto diferentes orígenes, incluyéndose el hematopoyético, fibroblástico, mesenquimal y neuroectodérmico (Owen and Lessnick, 2006).

En un principio, la hipótesis más aceptada era que los tumores de Ewing derivaban de células progenitoras de la cresta neural, basándose en algunas características observadas en los mismos, como la expresión de la enzima catecol acetil transferasa (implicada en la biosíntesis de neurotransmisores en nervios colinérgicos) y de la enolasa específica de neurona, así como en la capacidad de ciertas líneas celulares de Ewing para formar dendritas primitivas y expresar proteínas asociadas a neuronas en respuesta a agentes diferenciadores (Arvand et al., 2001; Cavazzana et al., 1987; Noguera et al., 1992; O'Regan et al., 1995; Staeger et al., 2004). Sin embargo, estudios recientes indican que los tumores de Ewing proceden de células madre mesenquimales, en las que su capacidad de diferenciación ha sido bloqueada por EWS/FLI1. Así lo evidencia el hecho de que el silenciamiento de las proteínas de fusión características de los tumores de Ewing (en concreto EWS/FLI1), provoca la reexpresión de marcadores de células madre mesenquimales (CD44, CD54, CD59 y CD73), y les confiere características esenciales de las mismas como es la diferenciación, en presencia de los agentes adecuados, a los tres lineajes mesenquimales; adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Tirode et al., 2007). Por otro lado, las células madre mesenquimales humanas (hMSC) son permisivas a la expresión de EWS/FLI1, que a su vez induce la expresión de genes específicos de células de Ewing (Riggi et al., 2008). La hipótesis del origen mesenquimal de los tumores de Ewing, es apoyada también por los estudios de Miyawaga, en los que se describe que la expresión ectópica de EWS/FLI1 o EWS/ERG en células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, les confiere un fenotipo similar al observado en las células de Ewing, induciendo la expresión de marcadores característicos de este tipo de células como CD54 (ICAM-1, *Intercellular Adhesion Molecule-1*), CD99 (MIC2), CD117 (KIT) y CD271 (NGFR, *Nerve growth factor receptor*) (Miyagawa et al., 2008).

1.1.2. Características clínicas y estrategias terapéuticas.

Un diagnóstico preciso del sarcoma de Ewing es crucial para seleccionar el tratamiento más apropiado. Por tanto, es necesaria una información clínica adecuada, así como un conocimiento de las características morfológicas, inmunocitoquímicas y estructurales, para diferenciarlo de otros tumores de células pequeñas y redondas. En niños, éstos incluyen neuroblastoma, rabdomiosarcoma y algunos tipos de linfomas. En adultos, deber ser diferenciado de casos de linfoma, mieloma múltiple y cáncer de células pequeñas de pulmón (Kennedy et al., 2003).

Muchos pacientes con sarcoma de Ewing presentan dolor localizado y una masa visible o palpable (Widhe and Widhe, 2000). Algunos síntomas sistémicos, especialmente fiebre y pérdida de peso, son comunes sobre todo en pacientes que presentan la enfermedad en estado avanzado. Aproximadamente el 15% de los pacientes con sarcoma de Ewing en huesos largos presentan fracturas (Wagner et al., 2001).

Entre los marcadores inmunohistoquímicos utilizados en el diagnóstico diferencial de los tumores de Ewing, se incluye la glicoproteína transmembrana MIC2/CD99, presente en el 95-100% de los casos según los estudios (Kovar et al., 1990; Perlman et al., 1994). Este marcador se expresa también a niveles elevados en otros tumores de células pequeñas y redondas, como los osteosarcomas de células pequeñas, los sarcomas sinoviales y algunos rabdomiosarcomas, y por lo tanto no se trata de un marcador específico de los tumores de Ewing (Folpe et al., 2000; Hibshoosh and Lattes, 1997). El descubrimiento de la presencia de translocaciones cromosómicas características de los tumores de Ewing en 1984, ha permitido desde entonces realizar un diagnóstico definitivo mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) o RT-PCR (Aurias et al., 1983; Delattre et al., 1994; Turc-Carel et al., 1983).

Previo al tratamiento, debe estudiarse en qué fase de desarrollo se encuentra el tumor. El estudio del estadio está basado en la localización anatómica y en la presencia o ausencia de metástasis (Enneking et al., 1985), lo que permite clasificar a los pacientes con vistas al tratamiento.

En la actualidad, los tumores de Ewing se tratan agresivamente con una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia (Meyers and Levy, 2000; Rodriguez-Galindo et al., 2003). A pesar de que los tratamientos establecidos durante la pasada década han mejorado el pronóstico de la enfermedad, la supervivencia global a los cinco años es del 60-65% (Scotlandi, 2006) y la supervivencia a largo plazo es baja debido a la recurrencia de la enfermedad. Los

valores de supervivencia varían mucho según el grupo de riesgo, siendo superiores al 85% en pacientes con enfermedad localizada en los huesos de las extremidades, y menores del 30 % en pacientes con metástasis en la médula ósea en el momento del diagnóstico (Hendershot, 2005; Leavey and Collier, 2008; West et al., 1997; Zoubek et al., 1998). La tasa de supervivencia ha permanecido estancada en las dos últimas décadas, lo que hace necesario encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan mejorar este dato.

Se están evaluando distintas estrategias como nuevos abordajes terapéuticos, entre los que destacan:

- La inhibición de la expresión de las proteínas de fusión EWS/FLI1 mediante técnicas de ARN de interferencia o similares; esta estrategia es efectiva *in vitro* y en modelos animales (Hu-Lieskovan et al., 2005a; Kovar et al., 1996; Lambert et al., 2000; Ouchida et al., 1995; Prieur et al., 2004; Siligan et al., 2005; Tanaka et al., 1997; Toretsky et al., 1997; Yi et al., 1997) pero su aplicación clínica requiere el desarrollo de tecnologías más seguras y efectivas.

- La disminución de la proliferación celular mediante el uso de moléculas pequeñas como la rapamicina, empleada para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos, que bloquea eficientemente la proliferación de las líneas celulares causando un arresto del ciclo celular en G1. Este efecto ocurre en paralelo con una disminución en los niveles de EWS/FLI-1, y concomitante con la restauración de los niveles de ARN mensajero del receptor del TGF-beta tipo 2, inhibido por EWS-FLI1. Diversos trabajos demuestran que la señalización a través de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) juega un papel central en la patobiología del sarcoma de Ewing y sugieren que el uso de rapamicina puede ser útil en el tratamiento del mismo (Mateo-Lozano et al., 2006; Mateo-Lozano et al., 2003).

- La inhibición de la ruta de señalización IGF-1, que desempeña un papel fundamental en la supervivencia celular de los tumores de Ewing. (1993; Kim et al., 2005; Mitsiades et al., 2004; Prieur et al., 2004; Yee et al., 1990). De hecho, varios estudios han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, la eficiencia de tratamientos en los que se combinan las drogas clásicas de quimioterapia junto con inhibidores de la ruta autocrina del factor de crecimiento IGF-1; anticuerpos dirigidos contra el receptor de IGF-1 (IGF1R) como IMC-A12, SCH 717454 o figitumumab, que se están analizando en ensayos clínicos (Kolb et al., 2008; Olmos et al., 2010) o inhibidores de su actividad tirosina quinasa como NVP-AEW541 o NVP-ADW742 (Benini et al., 2001; Manara et al., 2007; Martins et al., 2006; Scotlandi et al., 2002b).

- La inducción de la apoptosis a través de distintos métodos: el bloqueo con anticuerpos monoclonales de la proteína de superficie CD99 (que se expresa a elevados niveles en las células de Ewing)(Kovar et al., 1990; Rocchi et al., 2010; Scotlandi et al., 2006), la inhibición de metaloproteinasas de la matriz (induce la apoptosis mediada por FAS) (Mitsiades et al.,

1999) o bien mediante el uso de interferón-beta (Sanceau et al., 2000) o de antagonistas de los receptores de CCK, como el Devazepide (Carrillo et al., 2009).

- La disminución de la angiogénesis mediante la inhibición de VEGF, que se ha visto que reduce el potencial oncogénico de las líneas celulares de Ewing (Guan et al., 2005). Un anticuerpo anti-VEGF humanizado, bevacizumab, ha dado buenos resultados en el tratamiento del cáncer colorrectal, del carcinoma no microcítico de pulmón, del cáncer de mama o del glioblastoma entre otros, al igual que ciertos compuestos que bloquean la actividad tirosina quinasa del receptor de VEGF, y por tanto podrían usarse en el tratamiento de los tumores de Ewing (Ahmed et al., 2004; Bonomi, 2010; Collins and Hurwitz, 2005; Ferrara, 2002; Minniti et al., 2009; Tkaczuk, 2009).

1.1.3. Características moleculares.

Los tumores de la familia Ewing se caracterizan desde el punto de vista molecular por la presencia de translocaciones cromosómicas específicas que dan lugar a proteínas de fusión. Dichas proteínas de fusión comprenden el extremo N-terminal de uno de los miembros de la familia de proteínas TET (EWS, y en raras ocasiones TLS/FUS) (Figura 1) y el extremo C-terminal de algunos miembros de la familia de factores de transcripción ETS (FLI1, ERG, FEV, E1AF y ETV1) (Figura 2) (Mackintosh et al., 2010). El gen EWS (*Ewing Sarcoma*) puede fusionarse con cualquiera de los miembros de la familia ETS mencionados, mientras que el gen TLS/FUS sólo se ha observado fusionado con el factor de transcripción ERG (Tabla I).

Tabla I. Tipos de translocaciones y sus proteínas quiméricas correspondientes, identificadas en los tumores de Ewing

Translocación	Proteína quimérica	Incidencia	Referencia
t(11;22)(q24;q12)	EWS/FLI1	90-95 %	(Delattre et al., 1992)
t(21;22)(q22;q12)	EWS/ERG	5-10 %	(Sorensen et al., 1994 ; Zucman et al., 1993)
t(7;22)(p22;q12)	EWS/ETV1	< 1 %	(Jeon et al., 1995)
t(2;22)(q33;q12)	EWS/FEV	< 1 %	(Peter et al., 1997)
t(17;22)(q12;q12)	EWS/E1AF	< 1 %	(Kaneko et al., 1996; Urano et al., 1996)
t(16;21)(p11;q22)	FUS/ERG	< 1 %	(Shing et al., 2003)

La translocación más frecuente, que se produce en el 90% de los casos, es la t(11;22)(q24;q12), que da lugar a una proteína de fusión entre los genes EWS y FLI1 (*Friend Leukaemia Integration 1*) (Delattre et al., 1994). En un 5% de los casos se produce la translocación t(21;22)(q22;q12), que da lugar a una fusión entre los genes EWS y ERG (*Ets Related Gene*) (Sorensen et al., 1994; Zucman et al., 1993). El resto de las translocaciones identificadas son muy infrecuentes y se producen en el 5% restante de los casos; t(2;22)(q33;q12) en la que EWS se fusiona a FEV (*Fifth Ewing Variant*) (Peter et al., 1997); t(17;22)(q12;q12) en la que EWS se fusiona a E1AF (*E1A Factor* o ETV4, *Ets Variant Gene 4*) (Kaneko et al., 1996; Urano et al., 1996); t(7;22)(q22;q12) en la que EWS se fusiona a ETV1 (*Ets Translocation Variant 1*) (Jeon et al., 1995) y t(16;21)(q11;q22) en la que TLS/FUS se fusiona a ERG (Shing et al., 2003).

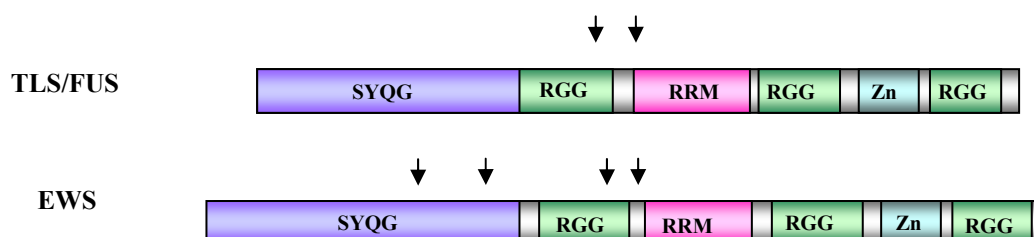


Figura 1. Miembros de la familia de proteínas TET que forman parte de las translocaciones cromosómicas características de los tumores de la familia Ewing. Los miembros de esta familia poseen un dominio de 87 aminoácidos denominado RRM (RNA Recognition Motif), que interviene en uniones ARN-proteína. Asimismo, contienen un número variable de repeticiones RGG (Arginine-Glycine-Glycine) que facilitan también las interacciones con el ARN. Debido a esta estructura, las proteínas de esta familia parecen participar en el procesamiento y/o la transcripción de los ARN mensajero. El extremo N-terminal contiene una serie de repeticiones degenerativas del dipéptido serina-tirosina, además de ser una región rica en glutamina y glicina (SYQG: Serine-Tyrosine-Glutamine-Glycine). La región N-terminal se asocia con el complejo TFII, ciertas subunidades de la ARN polimerasa II y con el coactivador CBP/p300, por lo que dicha región tiene actividad transactivadora. Es la región N-terminal la que se fusiona con la región C-terminal de los factores de transcripción ETS, y está presente en todas las proteínas de fusión. (Las flechas indican los puntos de fusión con los factores de transcripción de la familia ETS). Zn: dedos de Zinc.

El punto de fusión de cada uno de los genes se produce a nivel de diferentes exones tanto de los genes EWS o TLS/FUS como de los factores de transcripción ETS, de forma que se han descrito hasta 12 fusiones diferentes (Zoubek et al., 1996; Zoubek et al., 1994; Zucman et al., 1993). Las dos fusiones más comunes son las denominadas de tipo I (en la que el exón 7 de EWS se yuxtapone al exón 6 de FLI1) y la de tipo II (en la que el exón 7 de EWS se fusiona al exón 5 de FLI1). Ambas fusiones se producen en el 80% de los casos. Aunque algunos estudios retrospectivos parecían indicar que el tipo de fusión EWS/FLI1 tenía significado pronóstico (de

Alava et al., 1998; Kauer et al., 2009; Zoubek et al., 1996), dos estudios recientes muestran que no es así (Le Deley et al., 2010; van Doorninck et al., 2010). En el caso de las proteínas EWS/ERG, se han descrito hasta cinco variantes, siendo la más abundante la fusión del exón 7 de EWS al exón 6 de ERG (Ginsberg et al., 1999; Zoubek et al., 1994; Zucman et al., 1993).

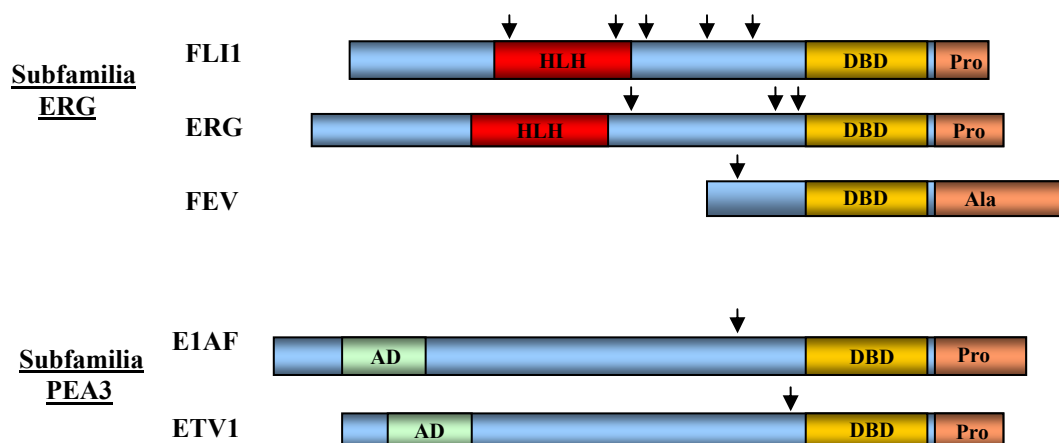


Figura 2. Factores de transcripción de la familia ETS implicados en las translocaciones características de los tumores de Ewing. La familia ETS comprende entre otras a la subfamilia ERG, a la que pertenecen FLI1, ERG y FEV, y la subfamilia PEA3, en la que se incluyen ETV1 y E1AF. Los distintos miembros de la familia ETS se clasifican según su homología en el dominio DBD (*DNA Binding Domain*), la posición relativa de dicho dominio y la presencia de otros dominios transactivadores o implicados en interacciones proteína-proteína. El DBD es un dominio altamente conservado compuesto por 87 aminoácidos, que reconoce la secuencia (GGAA/T) en el ADN. Este dominio, localizado en la región C-terminal de la molécula, forma parte de todas las proteínas de fusión características de los tumores de Ewing. Las flechas indican los diferentes puntos de fusión con EWS identificados en los tumores de Ewing. AD: *Acidic Domain*, que forma parte del dominio de activación N-terminal. Pro: dominio de activación rico en prolina. HLH: *Helix-loop-helix*.

Además de las translocaciones descritas, en los tumores de Ewing se han identificado otras alteraciones genéticas recurrentes. Entre dichas alteraciones se encuentran: la delección homocigótica del locus p16, presente en el 25-30% de los tumores de Ewing (Kovar et al., 1997); la translocación t(1;16), que se ha observado en el 20% de los casos, la ganancia de un cromosoma 8 (trisomía) que tiene lugar en el 35-55% de los casos, la ganancia de un cromosoma 12 en el 25% de los casos, así como la presencia de deleciones en 1p36 en el 18% de los casos (Armengol et al., 1997; Hattinger et al., 1999; Hattinger et al., 2000).

1.2. Propiedades oncogénicas de las proteínas de fusión EWS/ETS.

Diversos estudios realizados desde el descubrimiento de las proteínas de fusión EWS/ETS en los años 90, demuestran que se trata de factores de transcripción aberrantes, indispensables para el desarrollo de los tumores de Ewing (Figura 3).

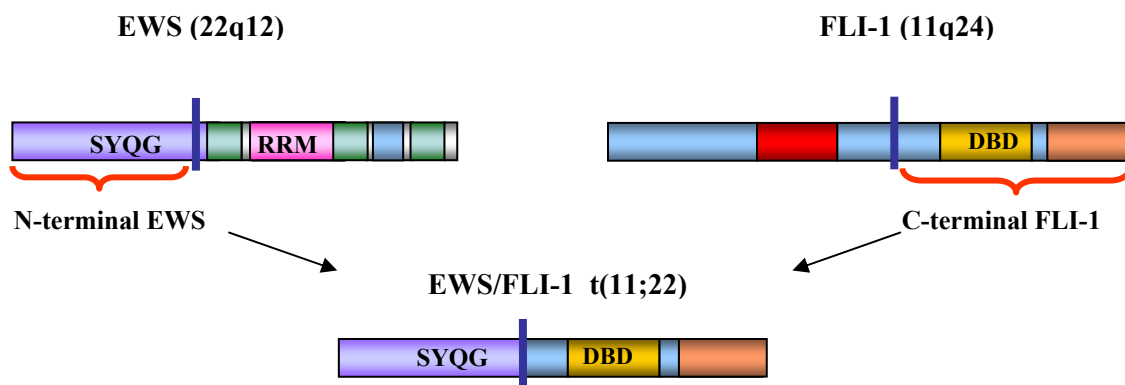


Figura 3. Dominios funcionales de EWS y de FLI1 que intervienen en el factor de transcripción quimérico EWS/FLI1. La proteína de fusión más frecuente en los tumores de Ewing es EWS/FLI1, presente en el 90 % de los casos. En la figura se muestran los distintos dominios que forman parte de cada una de las proteínas nativas (EWS y FLI1), así como las distintas regiones de cada una de ellas involucradas en la proteína de fusión EWS/FLI1. SYQG: *Serine-Tyrosine-Glutamine-Glycine*, RRM: *RNA Recognition Motif*, DBD: *DNA Binding Domain*

El papel oncogénico de las proteínas de fusión se puso de manifiesto por primera vez en estudios realizados en fibroblastos de ratón NIH3T3, a los que la expresión de EWS/FLI1 confiere propiedades de células transformadas, como la formación de colonias en agar blando y la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos, así como características histológicas similares a las de los tumores de Ewing (Kovar et al., 1996; May et al., 1993a; May et al., 1993b; Ouchida et al., 1995; Tanaka et al., 1997; Thompson et al., 1999; Yi et al., 1997). Sin embargo, la expresión de FLI1 en dichas células no produce los mismos efectos, indicando que EWS/FLI1 y FLI1 son funcionalmente diferentes. Otros estudios indican un efecto diferente de EWS/FLI1 en función del contexto celular, de manera que su expresión es letal en fibroblastos primarios humanos y fibroblastos embrionarios de ratón (Deneen and Denny, 2001; Lessnick et al., 2002). Estas líneas celulares se vuelven permisivas a la expresión de EWS/FLI1 si se eliminan, mediante manipulaciones genéticas, los genes $p53$, $p16^{\text{INK4}}$ o $p19^{\text{ARF}}$, por lo que en determinados sistemas celulares parecen ser necesarias alteraciones secundarias para soportar la expresión de EWS/FLI1 (Deneen and Denny, 2001).

Diversos trabajos sugieren que EWS/FLI1 actúa como inhibidor de la diferenciación específica de tejido. Así, la expresión ectópica de EWS/FLI1 inhibe la diferenciación osteogénica y adipogénica en células del estroma de la médula ósea (Torchia et al., 2003) y la diferenciación miogénica de los mioblastos de ratón C2C12 (Eliazar et al., 2003). Por otro lado, los tumores formados por células NIH3T3 transformadas con EWS/FLI1, adquieren un cierto grado de diferenciación neural, así como morfología de células pequeñas y redondas, característica de las células de Ewing (Hu-Lieskovan et al., 2005b). Por tanto, EWS/FLI1 es capaz de inducir un fenotipo neural similar al de las células de Ewing en determinados contextos celulares, a la vez que bloquea el programa de diferenciación celular en otros.

Más adelante, y gracias a la utilización de distintas técnicas que permiten silenciar EWS/FLI1 en las propias células de Ewing, se han obtenido datos concluyentes sobre el papel central de las proteínas de fusión en el desarrollo y crecimiento de los tumores de Ewing. De esta manera, la inhibición de EWS/FLI1 en líneas celulares de Ewing produce una disminución de la tasa de crecimiento como consecuencia de una acumulación de las células tumorales en la fase G1 del ciclo celular, incrementa su susceptibilidad a la apoptosis, inhibe su capacidad para crecer independiente de anclaje y previene la formación de tumores en ratones desnudos. (García-Aragoncillo et al., 2008; Hu-Lieskovan et al., 2005a; Kovar et al., 1996; Lambert et al., 2000; Ouchida et al., 1995; Prieur et al., 2004; Siligan et al., 2005; Tanaka et al., 1997; Toretsky et al., 1997; Yi et al., 1997).

Las propiedades oncogénicas de EWS/FLI1 dependen de su capacidad de unión al ADN; por ello, a pesar de la heterogeneidad estructural de las distintas proteínas de fusión EWS/ETS, todas mantienen intacto el dominio de unión a ADN del miembro de la familia ETS que forma parte de la translocación. Además, la inactivación de este dominio, mediante mutagénesis dirigida, provoca una reducción o anulación de la capacidad transformante de la proteína quimérica (Jaishankar et al., 1999; May et al., 1993b). Igualmente importante para el mantenimiento de sus propiedades oncogénicas es la capacidad de EWS/FLI1 para activar la transcripción a través del dominio N-terminal de EWS (Bailly et al., 1994; Mao et al., 1994; May et al., 1993a; Ohno et al., 1993). De hecho, la delección de este dominio transactivador reduce el potencial oncogénico de EWS/ETS (Lessnick et al., 1995). Estudios previos indican que ese dominio N-terminal induce ciertas características transformantes en células NIH3T3, incluso en ausencia de un dominio de unión a ADN funcional (Welford et al., 2001). En definitiva, estos trabajos ponen de manifiesto que tanto el fragmento del gen EWS como el del miembro de la familia ETS que dan lugar a la proteína de fusión EWS/ETS, son responsables e imprescindibles para mantener su potencial oncogénico. El dominio N-terminal de EWS media

las interacciones proteína-proteína y actúa como un potente activador transcripcional, mientras que el dominio C-terminal del factor de transcripción ETS, donde reside la capacidad de unión a ADN, lleva a cabo la selección de los genes regulados.

La proteína de fusión EWS/ETS es capaz de regular diversos genes de manera directa, pero también de manera indirecta, a través de otros factores de transcripción. En los casos en que la regulación es directa, el factor de transcripción quimérico EWS/ETS se une preferiblemente a dos tipos de secuencias: los motivos consenso ETS y los microsatélites con varias repeticiones (al menos 4) de la secuencia GGAA. En este último caso, la activación de la transcripción es altamente dependiente del número de repeticiones GGAA presentes en el promotor de los mismos, y aunque se desconoce el mecanismo implicado, se ha propuesto que una unión cooperativa o un aumento en la probabilidad de unión debido a la alta concentración de sitios de unión pueden explicar esta correlación (Gangwal et al., 2008; Garcia-Aragoncillo et al., 2008; Guillon et al., 2009).

1.3. Genes regulados por las proteínas quiméricas EWS/ETS.

Las proteínas de fusión EWS/FLI1 se caracterizan por su capacidad para activar o reprimir la expresión de diversos genes. De ahí la importancia de identificar genes que pueden estar potencialmente regulados por EWS/FLI1 y que nos permitan conocer en más profundidad los complejos mecanismos moleculares que dan lugar al desarrollo de los tumores de Ewing. Se ha demostrado que EWS/FLI1 regula la expresión génica, directa o indirectamente, de un gran número de genes implicados en los procesos centrales en la génesis del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2000). En la siguiente tabla se exponen algunos de estos genes, agrupados según su funcionalidad (Tabla II).

Tabla II. Genes regulados por EWS/FLI1

Genes inducidos por EWS/FLI1	Regulación	Función/Característica	Referencia
PDGF-C	Indirecta	Proliferación celular	Zwerner and May 2001
CCND1	Indirecta (a través de Sp1)	Proliferación celular Supervivencia celular	Fuchs et al. 2004 Hu et al. 2008
MYC	Indirecta	Proliferación celular Supervivencia celular	Dauphinot et al. 2001 Nishimori et al. 2002
GLI1	Directa (Microsatélites GGAA)	Proliferación celular	Beauchamp et al. 2009 Jay et al. 2009
CCK DAX1 (NR0B1)	¿Indirecta? Directa (Microsatélites GGAA)	Proliferación celular Proliferación celular	Carrillo et al. 2007 García-Aragoncillo et al. 2008
ID2	Directa	Ciclo celular	Nishimori et al. 2002
hTERT	Indirecta (CBP/p300)	Senescencia	Fuchs et al. 2004
VEGF	Indirecta (Sp1)	Angiogénesis	Guan et al. 2005 Fuchs et al. 2004
Tenascina C	Directa (sitio de unión ETS)	Angiogénesis	Watanabe et al. 2003
CAV1	Directa (sitio de unión ETS)	Angiogénesis	Tirado et al. 2006

Genes reprimidos por EWS/FLI1	Regulación	Función/Característica	Referencia
p21 ^{WAF/CIP1}	Directa Indirecta	Crecimiento celular	Nakatani et al. 2003 Hu et al. 2008
p27 ^{KIP1}	Indirecta	Crecimiento celular	Matsumoto et al. 2001 Hu et al. 2008
p57 ^{KIP2}	¿Indirecta?	Crecimiento celular	Matsumoto et al. 2001
TGFR2	Directa (sitio de unión ETS)	Crecimiento celular	Kovar et al. 2003

Gracias a estos estudios, podemos afirmar que las proteínas de fusión EWS/ETS desempeñan un papel central en el desarrollo de los tumores de Ewing a través de la regulación, directa o indirecta, de genes implicados en el desarrollo tumoral. Aunque el conocimiento acerca de los genes diana de las proteínas de fusión EWS/ETS ha avanzado considerablemente en los últimos años, es necesario identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan mejorar el tratamiento de los tumores de Ewing.

Los estudios de expresión diferencial en ausencia y presencia de EWS/FLI1, realizados mediante matrices de oligonucleótidos en nuestro laboratorio, nos ha permitido identificar algunos de los genes diana de la proteína quimérica, entre los que se encuentran CCK y DAX1 (Carrillo et al., 2007; Garcia-Aragoncillo et al., 2008; Mendiola et al., 2006). De acuerdo con estos estudios de expresión génica, otro gen diana de EWS/FLI1 es el que codifica para la enzima Lisil Oxidasa (*LOX*). Además del papel estructural que desempeña LOX en el mantenimiento de la matriz extracelular, se ha demostrado su implicación en diversos tipos de cáncer, realizando diferentes funciones, que abarcan desde la supresión tumoral hasta la promoción metastásica. En el caso de los tumores de Ewing, LOX aparece reprimido por EWS/FLI1, lo que sugiere que podría estar actuando como supresor tumoral en este tipo de tumores. Estos resultados nos animaron a iniciar una línea de investigación, encaminada a identificar los mecanismos de regulación de LOX por EWS/FLI1 así como a estudiar su papel funcional en los tumores de la familia Ewing.

1.4 Características de la enzima Lisil Oxidasa (*LOX*).

1.4.1. Organización génica de *LOX* y estructura proteica.

El gen que codifica para la enzima Lisil Oxidasa se identificó por primera vez en 1968, a partir de cDNA de rata neonatal (Krawetz, 1994). El gen humano de *LOX* se encuentra en el cromosoma 5 (5q23.3-31.2), está formado por 7 exones y 6 intrones y tiene un tamaño de 15 Kb. Codifica para ARN mensajeros de distintos tamaños debido a que la región 3'UTR del exón 7 presenta múltiples sitios de poliadenilación.

La proteína LOX es secretada al espacio extracelular y se sintetiza como una prepro-enzima de 417 aminoácidos que contiene una secuencia de 21 aminoácidos en el extremo N-terminal que actúa como péptido señal para su secreción. Durante su paso por el aparato de Golgi, se incorpora un átomo de cobre (Cu^{2+}) y se forma el cofactor lisil-tirosilquinona, que

ocupa el sitio activo del enzima. La pre-proteína LOX secretada tiene un tamaño de 50 KDa y está N-glicosilada. Una vez en el espacio extracelular, la región propéptido es liberada por la proteinasa procolágeno C (PCP) dando lugar a la enzima catalíticamente activa de 32 KDa (Figura 4). La activación proteolítica tiene lugar mediante la formación de un complejo con fibronectina (FN) (Huang et al., 2009; Uzel et al., 2001; Uzel et al., 2000).

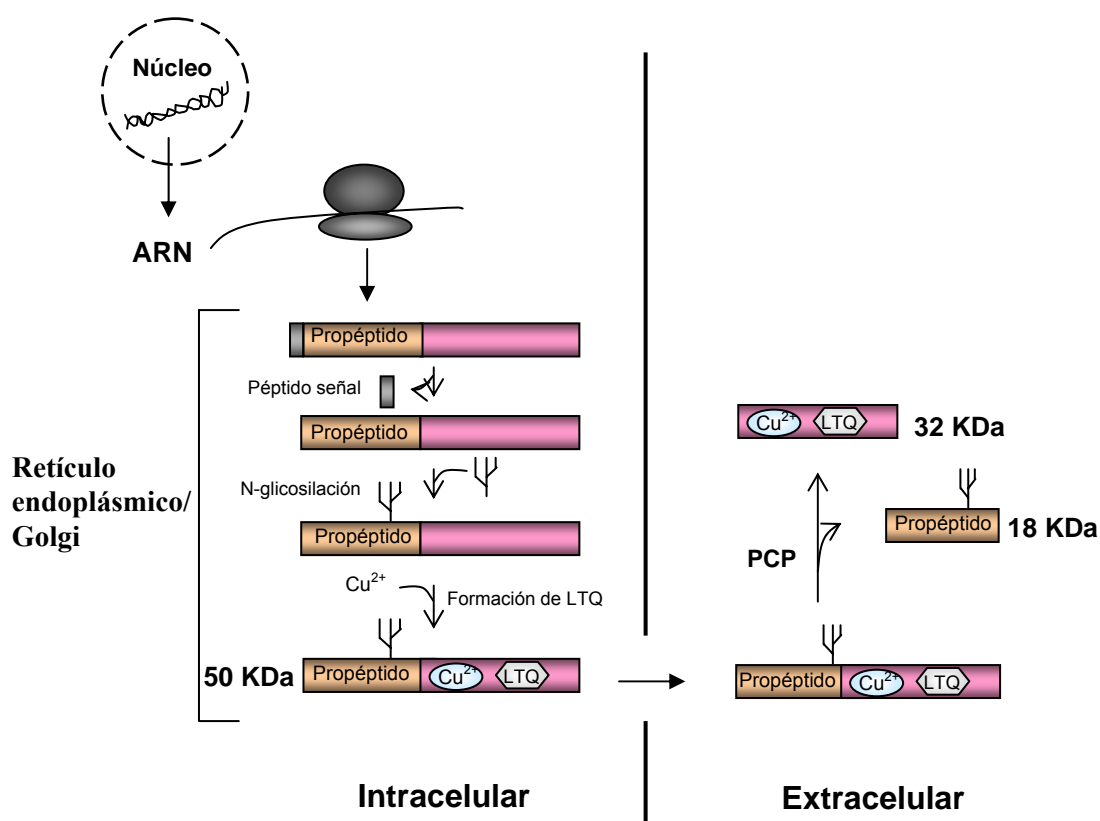







Figura 4. Ruta de la biosíntesis de LOX. El precursor de LOX entra en el retículo endoplásmico, donde se libera el péptido señal y se N-glicosila. La unión del cobre (Cu^{2+}) y la formación del cofactor lisil-tirosilquinona (LTQ) puede ocurrir en el retículo endoplásmico o durante el tráfico de proteínas por el aparato de Golgi. Después de la secreción del precursor de LOX al espacio extracelular, la región propéptido es liberada por la proteinasa procolágeno C (PCP), para obtener la enzima activa de 32 KDa.

Se han identificado 4 isoenzimas de LOX, las denominadas *LOX-like proteins* (LOXL): LOXL1, LOXL2, LOXL3 y LOXL4, que se sitúan en distintos cromosomas y codifican para proteínas de distinto tamaño (Tabla III). Todas ellas presentan un péptido señal en el extremo N-terminal, seguido de una región de secuencia variable que determina las distintas funciones o localización celular específica de cada miembro de la familia LOX. El extremo C-terminal está muy conservado en todas ellas, siendo el responsable de la actividad catalítica. Esta región contiene el sitio de unión del átomo de cobre, el dominio receptor de citoquinas (CRL) y el sitio

de formación del cofactor lisil-tirosilquinona (LTQ). LOXL2, LOXL3 y LOXL4 presentan 4 dominios SRC (dominio rico en cisteínas implicado en las interacciones proteína-proteína) a continuación del péptido señal (Tabla III) (Molnar et al., 2003; Thomassin et al., 2005). Por tanto, en base a las similitudes en la estructura y secuencia de la región N-terminal, los miembros de la familia LOX se pueden dividir en dos subgrupos; LOXL2, LOXL3 y LOXL4 como un grupo cuyas regiones N-terminal contienen cuatro dominios ricos en cisternas, y LOX y LOXL1 como un grupo separado con una región N-terminal más pequeña y simple, y que no contiene residuos de cisteína (Lucero and Kagan, 2006).

Tabla III. Familia de proteínas LOX: Organización genómica y proteica.

Gen	Cromosoma (localización y organización génica)	Dominios	Longitud y tamaño de la proteína
LOX	5q23,3-31,2 7 exones		417 aminoácidos proenzima 50KDa enzima activa 32KDa
LOXL1	15q22 7 exones		574 aminoácidos polipéptido 63 KDa
LOXL2	8p21,2-21,3 11 exones		774 aminoácidos polipéptido 87 KDa
LOXL3	2p13,3 14 exones		753 aminoácidos polipéptido 80 KDa
LOXL4	10q24 14 exones		756 aminoácidos polipéptido 82 KDa

La variedad de dominios proteicos presentes en la proteína LOX sugiere la posibilidad de múltiples funciones biológicas, no sólo debido a modificaciones post-traduccionales llevadas a cabo por la actividad catalítica de LOX, sino también a interacciones proteína-proteína que pueden activar o inactivar vías de señalización implicadas en tumorigénesis o progresión metastásica, como se detalla en los siguiente apartados.

1.4.2. Actividad catalítica de LOX.

La primera función caracterizada de LOX fue su actividad enzimática, ya que se trata de una enzima extracelular dependiente de cobre que cataliza la desaminación oxidativa del grupo ϵ -amino de residuos de lisina en moléculas de colágeno y de elastina. Esta reacción da lugar al compuesto intermediario alisina (Figura 5), que sufre condensaciones espontáneas mediante

entrecruzamientos covalentes intra e intermoleculares, y da lugar a las fibras de colágeno y elastina insolubles de la matriz extracelular. Dichos entrecruzamientos determinan la tensión y propiedades mecánicas de la matriz extracelular, y contribuyen al mantenimiento de la estabilidad y normal funcionalidad de los tejidos conectivos (Lucero and Kagan, 2006; Rodriguez et al., 2008b; Smith-Mungo and Kagan, 1998).

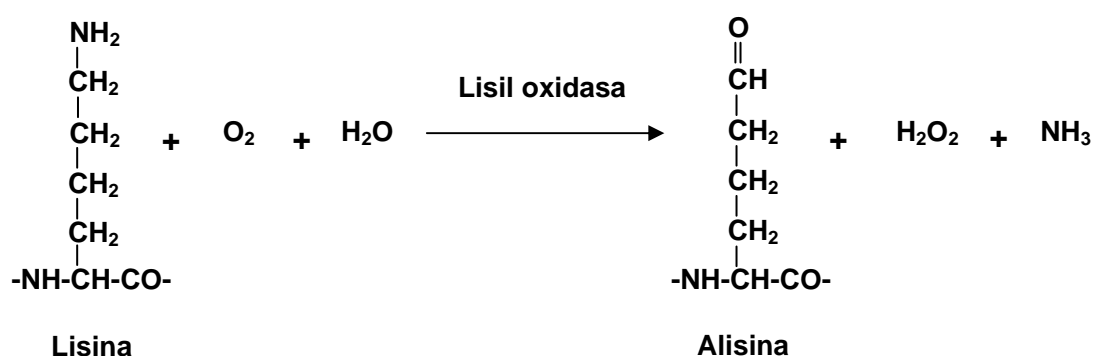


Figura 5. Estequiometría de la reacción catalizada por LOX. Lisil oxidasa desamina oxidativamente peptidil lisina para dar lugar a peptidil α -aminoadipídico- δ -semialdehído (alisina) que espontáneamente reacciona con otros aldehídos para formar varios entrecruzamientos di-, tri- o tetrafuncionales (Kagan 1986)

Sin embargo, estudios recientes demuestran que el papel biológico de LOX se extiende más allá de la oxidación de proteínas estructurales de la matriz extracelular, ya que también influye en el desarrollo tisular, la proliferación celular y la migración, y puede actuar como antagonista o promotor de procesos malignos (Kagan and Li, 2003; Payne et al., 2007). También se ha demostrado que a pesar de que LOX es secretado, la enzima madura de 32 KDa puede entrar de nuevo en las células y concentrarse en el núcleo (Hayashi et al., 2004; Li et al., 1997; Nellaiappan et al., 2000). Una vez en el núcleo, LOX es capaz de inducir cambios en la cromatina, por desaminación de componentes de la misma como la histona H1, de manera que ésta reduce su carga positiva y se disocia del complejo de ribonucleoproteínas, permitiendo la transcripción del gen implicado (Giampuzzi et al., 2003b; Kagan et al., 1983). Esto demuestra que LOX también está implicado en la regulación de la expresión génica, como se ha descrito en el caso de los genes de colágeno III y elastina, cuya expresión es controlada por LOX (Giampuzzi et al., 2000; Lucero and Kagan, 2006; Rodriguez et al., 2008a).

1.4.3. LOX como supresor tumoral.

Además de su función catalítica, diversos trabajos demuestran que LOX también ejerce un papel como supresor tumoral. Contente y colaboradores fueron los primeros en aislar el ARN mensajero del llamado gen de rescisión de *ras* (*ras recission gene, rrg*), que estaba disminuido en fibroblastos transformados con *ras* (Contente et al., 1990). El tratamiento persistente de estos fibroblastos transformados con IFN α/β revertía el fenotipo transformado y daba lugar a la reexpresión de *rrg*. Más tarde se determinó que el gen de rescisión de *ras* correspondía a LOX (Kenyon et al., 1991). Estos resultados fueron confirmados por otros grupos (Hajnal et al., 1993; Oberhuber et al., 1995).

Posteriormente, Giampuzzi y colaboradores demostraron que la disminución de LOX en fibroblastos normales de riñón de rata (NRKF-49F, *Normal Rat Kidney Fibroblast*), conduce a un aumento en la proliferación celular y crecimiento independiente de anclaje, pérdida de regulación por IGF-1 y PDGF, y una activación constitutiva de *ras*, que a su vez incrementa los niveles de β -catenina y ciclina D1, a través de una vía de señalización no canónica (independiente de MAPK) de *ras* (Giampuzzi et al., 2001; Giampuzzi et al., 2005; Giampuzzi et al., 2003a). Por otro lado, la expresión de LOX en fibroblastos transformados con *ras* provoca una reducción en la activación de NF- κ B, un potente factor de transcripción implicado en la regulación del crecimiento celular y en transformación neoplásica. La inactivación de NF- κ B no se debe a una interacción directa con LOX, sino a la inhibición de la vía de señalización Akt/PI3K, ya que LOX impide la localización de PI3K en la membrana plasmática (Jeay et al., 2003).

No es la actividad catalítica de LOX la que media la supresión de las señales intracelulares que inducen transformación neoplásica, sino la región propéptido de LOX, ya que la acción de LOX no es alterada por el inhibidor irreversible y específico de LOX β -aminopropionitrilo (β APN) (Hurtado et al., 2008; Min et al., 2007; Pal et al., 2007; Palamakumbura et al., 2004; Palamakumbura et al., 2003; Palamakumbura et al., 2009; Wu et al., 2007).

Una de las características estructurales más interesantes de la región propéptido de LOX es que, a diferencia de la región C-terminal de la proenzima que se convierte en la enzima activa después del procesamiento proteolítico, la región N-terminal que corresponde al propéptido se trata de una proteína catiónica rica en argininas, propiedad que se conserva en ratón, rata y humano. El carácter básico del propéptido de LOX podría facilitar su entrada al interior de la

célula incluso en ausencia de un receptor específico, ya que la membrana plasmática es permeable a proteínas enriquecidas en arginina, y la entrada de dichas proteínas al interior celular es mediada por proteoglicanos heparan sulfato (Palamakumbura et al., 2004). El hecho de que la región propéptido no esté conservada en el resto de los miembros de la familia de proteínas LOX podría explicar porque LOX actúa como supresor tumoral, no siendo así en las demás proteínas de la familia LOX.

Diversos estudios demuestran que la disminución en la expresión del ARN mensajero de LOX es debido a metilación bialélica o pérdida de heterozigosidad y metilación del promotor, como ocurre en cáncer gástrico (Kaneda et al., 2004), o bien a mutaciones somáticas, como las que tienen lugar en cáncer colorrectal (Csiszar et al., 2002). Otros estudios sugieren la implicación de las vías de factores de crecimiento autocrino, como FGF-2, en la expresión reducida de LOX en células transformadas (Hamalainen et al., 1995; Palamakumbura et al., 2004).

1.4.4. LOX como promotor de metástasis.

Se ha demostrado que niveles elevados de ARN mensajero y/o proteína de LOX son un factor de mal pronóstico en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello y en carcinoma oral de células escamosas, asociándose con tumores poco diferenciados y de alto grado, con mayor recurrencia y menor supervivencia, (Albinger-Hegyi et al., 2010; Erler et al., 2006; Payne et al., 2005).

Diversos estudios han demostrado que hay un incremento en la expresión de LOX en células de cáncer de mama invasivo (Kirschmann et al., 2002; Kirschmann et al., 1999; Payne et al., 2007), y que la invasión de estas células en un sistema *in vitro* es facilitado por la actividad catalítica de LOX, ya que su respuesta quimiotáctica es mediada por el H₂O₂ producido por la actividad catalítica de LOX (Lazarus et al., 1995; Li et al., 2000; Lucero et al., 2008). La activación del complejo de señalización FAK/Src por la expresión exógena de la enzima madura de LOX, promueve un fenotipo migratorio a través de la vía de p130^{Cas}/Crk/DOCK180 y de la posterior activación de Rac1 y Cdc42 (asociados con la formación de lamelipodios y filopodios respectivamente, dando lugar a un fenotipo móvil) e inactivación de Rho (impidiendo la formación de fibras de estrés de actina, típicamente asociadas con un fenotipo no móvil) (Payne et al., 2006).

Por otro lado, Erler y colaboradores demostraron que un aumento en la expresión de LOX bajo condiciones de hipoxia es esencial para la respuesta metastásica, inducida por hipoxia, en las células de cáncer de mama y de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC, *Head and neck squamous cell carcinoma*) (Erler et al., 2006). De hecho, la expresión de LOX es regulada por el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (*hypoxia-inducible transcription factor 1*, *HIF-1*) (Erler et al., 2006; Postovit et al., 2008).

También se ha establecido una asociación entre LOX y el proceso de transición epiteliomesénquima (TEM) (Higgins et al., 2007), el paso inicial para la formación de metástasis. Además se ha demostrado que en situación de hipoxia, Notch facilita la unión de HIF-1 al promotor de LOX, aumentando su expresión, y favoreciendo así la estabilización de Snail (Sahlgren et al., 2008). Otros grupos mantienen la hipótesis de que la expresión de LOX en el estroma aumenta la formación de fibras de colágeno, incrementando la rigidez de la matriz extracelular, lo que lleva a una pérdida de diferenciación de las células epiteliales y progresión tumoral (Paszek et al., 2005; Payne et al., 2007).

Otra prueba de la posible participación de LOX en la progresión tumoral metastásica en cáncer de mama proviene de ensayos clínicos en los que pacientes con metástasis son tratados con tetratiomolibdato (TM), un agente que acompleja con el cobre, lo que provoca una estabilización de la enfermedad (Goodman et al., 2005). Anteriormente se determinó que hay relación entre la cantidad de cobre en la dieta y la actividad de LOX (Rucker et al., 1998).

En resumen, hay suficientes evidencias que muestran que LOX puede actuar tanto como supresor tumoral como promotor de metástasis en cáncer. Esta disparidad puede deberse al origen celular, estado de diferenciación, diferencias genéticas con respecto a la disponibilidad de sustratos de LOX, desequilibrio en la expresión/actividad del propéptido de LOX (PP-LOX) y de la enzima madura de LOX (LOXenz), interacciones entre las células tumorales y las del estroma, rigidez de la matriz extracelular, así como actividades biológicas pleomórficas de LOX (Payne et al., 2007).

1.4.5. LOX en fisiología y patología humana.

Estudios recientes muestran que LOX es necesario para el desarrollo de los órganos principales, como los sistemas cardiovascular y respiratorio (Hornstra et al., 2003; Maki et al., 2002). La deficiencia de LOX en ratones *knock-out* conduce a la muerte de la mayoría de los

animales al final del periodo gestacional o en las primeras horas de vida, debido a disección de la aorta, disfunción cardiovascular y ruptura del diafragma (Liu et al., 2004; Maki et al., 2005). A pesar de que LOX y LOXL1 tienen la misma actividad catalítica y se expresan en los mismos tejidos, una enzima no compensa a la otra en los animales *knock-out* debido quizás a distinta especificidad de sustrato, determinada por las proenzimas y no por la enzima madura (Thomassin et al., 2005).

También se ha visto una fuerte asociación entre la fibrosis que se produce en los órganos y un aumento en la actividad de LOX (Kagan, 1994; Kagan et al., 1986; Smith-Mungo and Kagan, 1998), por lo que se ha sugerido que la inhibición quimioterapéutica de la actividad lisil oxidasa puede ser una herramienta para el control de la fibrosis, ya que conduce a una acumulación de moléculas de colágeno más solubles y más susceptibles a degradación proteolítica.

Se ha detectado una actividad reducida de LOX en dos desórdenes de herencia recesiva ligados al cromosoma X; la enfermedad de Menkes y su variante más leve, el síndrome del cuerno occipital (*occipital horn syndrome, OHS*). Ambas enfermedades son causadas por mutaciones en el gen ATP7A, que codifica para una ATPasa tipo P, transportadora de cobre, lo que da lugar a una inadecuada disponibilidad de cobre (Poulsen et al., 2002). Los pacientes con la enfermedad de Menkes tienen serias anomalías en el desarrollo neural y del tejido conectivo y por lo general mueren prematuramente, mientras que los pacientes con OHS presentan cambios neurológicos ligeros y defectos en el tejido conectivo. En la enfermedad de Wilson se ha observado tanto un aumento como una disminución de LOX, que también es consecuencia de un metabolismo anómalo del cobre, atribuido a mutaciones en el gen ATP7B (Linz and Lutsenko, 2007). Estos pacientes presentan pérdida de memoria, temblores, cataratas y enfermedades hepáticas.

En cuanto al sistema nervioso central, se ha observado un aumento de LOX, o bien una distribución alterada, en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (Li et al., 2004). Además se ha caracterizado a LOX como un gen inducible por choque electroconvulsivo (Sun et al., 2005). La actividad de lisil oxidasa está aumentada en un 30% de los casos de Alzheimer y en demencia no asociada a Alzheimer, localizándose en las paredes de los vasos sanguíneos y en estructuras tipo plaquetas amiloides, típicas de estas enfermedades (Gilad et al., 2005).

En definitiva, podemos afirmar que LOX se trata de una enzima multifuncional, implicada en un amplio espectro de funciones biológicas, como regulación del desarrollo,

supresión tumoral, senescencia, control del crecimiento celular y quimiotaxis (Csiszar et al., 2002; Kagan and Li, 2003; Kaneda et al., 2004; Kirschmann et al., 2002; Palamakumbura et al., 2004; Payne et al., 2005). Los detalles moleculares de los mecanismos implicados en muchas de estas respuestas celulares a LOX aún se desconocen.

La proteína de fusión característica de los tumores de Ewing (EWS/FLI1) reprime la expresión de LOX, sugiriendo un posible papel de LOX como supresor de tumores en esta patología. El objetivo de esta tesis es clarificar el mecanismo de regulación de LOX así como su papel funcional en los tumores de la familia Ewing.

2. Objetivos

Los tumores de la familia Ewing se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas que dan lugar a factores de transcripción quiméricos. En el 90% de los casos, estas translocaciones dan lugar a una proteína de fusión que comprende el extremo N-terminal del gen EWS y el extremo C-terminal del factor de transcripción FLI1. La oncoproteína resultante, EWS/FLI1, es responsable del fenotipo tumoral de los tumores de Ewing, ya que actúa como un factor de transcripción aberrante que desregula la expresión de genes implicados en oncogénesis. Por tanto, la identificación de los genes potencialmente regulados por estas proteínas de fusión es fundamental para comprender en detalle la biología de estos tumores y para la identificación de nuevas dianas moleculares.

Mediante un estudio de matrices de oligonucleótidos, hemos observado que uno de los genes reprimidos por EWS/FLI1 es el que codifica para la enzima Lisil Oxidasa (LOX). Sin embargo, desconocemos el papel funcional de LOX en el desarrollo de los tumores de Ewing, así como su mecanismo de regulación. Esta Tesis pretende dar respuesta a estos dos aspectos.

Los objetivos concretos planteados son:

1- Estudiar la regulación de LOX por EWS/FLI1 y por factores de crecimiento en las células de Ewing.

Para ello se emplearán sistemas de ARN de interferencia inducible contra EWS/FLI1 en células de Ewing, y se analizará el efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 en la expresión de LOX a nivel de ARN mensajero. También se analizará la expresión de LOX en tumores y líneas celulares de Ewing. Así mismo, se estudiará el efecto de IGF-1 y FGF-2 sobre la regulación de los niveles de LOX.

2- Estudiar el papel funcional de LOX en el desarrollo de los tumores de Ewing.

Para ello se establecerán modelos de expresión inducible de distintas regiones de LOX y se estudiará el efecto de su expresión sobre las características transformantes y tumorigénicas de las células de Ewing.

3- Estudiar el mecanismo de acción de LOX en células de Ewing.

Para ello se analizará el efecto de la sobreexpresión de distintas regiones de LOX sobre las rutas de señalización AKT/PI3K y ERK/MAPK.

2. Materiales y Métodos

3.1. Material Biológico.

3.1.1. Líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas se cultivaron a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo se suplementó con suero bovino fetal (SBF)(10-20% según la línea celular), o con suero bovino fetal sin tetraciclina (SBF TET) en el caso de los sistemas inducibles por tetraciclina utilizados, así como con penicilina (100 u.i./ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Las características más importantes de las líneas celulares utilizadas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla IV. Líneas celulares.

Nombre	Tipo ⁽¹⁾	Medio de Cultivo	Características moleculares ⁽²⁾	Referencia
A673	SE	DMEM	t(11;22); EWS/FLI1 tipo I	(Frolik et al., 1984; Dauphinot et al., 2001)
SK-PN-DW	SE	IMDM	t(11;22); EWS/FLI1 tipo I	(Nelson et al., 1984)
RD-ES	SE	RPMI	t(11;22); EWS/FLI1 tipo II	(Giovannini et al., 1994; Dauphinot et al., 2001)
A4573	SE	DMEM	t(11;22); EWS/FLI1 10/6	(McKeon et al., 1988)
TC-71	SE	IMDM	t(21;22); EWS/FLI1 tipo I	(Whang-Peng et al., 1984)
SK-ES-1	SE	Mc Coy's	t(21;22); EWS/FLI1 tipo II	(Giovannini et al., 1994; Dauphinot et al., 2001)
SK-N-MC	SE	IMDM	t(11;22); EWS/FLI1 tipo I	(Bastida et al., 1985)
TTC-466	SE	RPMI	t(21;22); EWS/ERG tipo I	(Fults et al., 1992)
IMR-90	Fibroblastos	DMEM	p53-	(Nichols et al., 1977)
HEK-293	Epiteliales Riñón	DMEM	p53-, Ad5	(Graham et al., 1977)
Hela	ACa. Cérvix	DMEM	p53-	(Scherer et al., 1954)
U2OS	OS	Mc Coy's	pRb+, p53+	(Ponten et al., 1967)
Saos2	OS	Mc Coy's	pRb-, p53-	(Fogh et al., 1977)
HMEC	Endoteliales	DMEM	p53+	(Hakim, 1979)
SH-SH5Y	NB	DMEM	NMA-	(Biedler et al., 1978)
LnCap	Ca. Próstata	RPMI	p53+	(Horoszewicz et al., 1977)
MCF7	ACa. Mama	DMEM	p53+	(Sugarman et al., 1985)
H441	ACa. Pulmón	RPMI	p53-	(Gazdar et al., 1982)
HL60	LPA	IMDM	p53-	(Collins et al., 1977)

- (1) SE: Sarcoma de Ewing; PNET: Tumor primitivo neuroectodérmico; NB: Neuroblastoma. OS: Osteosarcoma. Aca: Adenocarcinoma. Ca: Carcinoma. LPA: Leucemia promielocítica aguda.
- (2) Se indican algunas de las características moleculares más relevantes de las líneas celulares empleadas, como el tipo de translocación y de proteína quimérica en las líneas de Ewing, la existencia de amplificación (NMA+) del oncogén *N-myc* en las líneas de neuroblastoma, así como es estatus funcional del gen *pBb* en las líneas de osteosarcoma y de *p53* en el resto de las líneas celulares. Ad5 indica que ésta línea celular está transformada con el ADN del adenovirus tipo 5.

3.1.2. Muestras tumorales

Las muestras tumorales utilizadas en esta Tesis fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido tras la exéresis y enviadas desde los respectivos Hospitales a nuestro laboratorio. En todos los casos se recabó el preceptivo consentimiento informado de los padres o tutores para su uso en investigación, según los protocolos autorizados por los Comités Éticos de Investigación Clínica de cada Hospital. Para la extracción de ARN, los tumores fueron pulverizados en nitrógeno líquido, y lisados en TRI-REAGENT (Sigma).

3.2. Plásmidos

En la siguiente tabla se muestran los plásmidos utilizados en la realización de esta tesis.

Tabla V. Plásmidos.

Nombre	Características	Procedencia
pLenti6/TR	Plásmido lentiviral de expresión del repressor de tetraciclina (TR).	Invitrogen
pENTR TM /H1/TO/shRNA	Plásmido de entrada del shRNA correspondiente.	Invitrogen
pLenti4/BLOCK-it TM -DEST/shRNA	Plásmido lentiviral de destino, que permite la expresión del shRNA correspondiente	Invitrogen
pENTR2B	Plásmido de entrada del ADNc del gen correspondiente.	Invitrogen
pLenti4/TO/V5-DEST	Plásmido lentiviral de destino, que permite la expresión del gen correspondiente.	Invitrogen

3.3. Establecimiento de líneas celulares de Ewing con expresión inducible de shRNA.

El sistema BLOCK-iT™ de Invitrogen nos permitió establecer líneas celulares de Ewing con expresión inducible de shRNAs. Este sistema utiliza las propiedades del represor de tetraciclina (TR) para controlar la expresión de los shARNs (ARNs pequeños en forma de horquilla), clonados en un vector de expresión bajo la dirección del promotor H1 humano, y que tiene insertadas dos copias de TeTO₂ (*tetracycline operator*). El procedimiento experimental se describe en Carrillo et al., 2007 y García-Aragoncillo et al., 2008.

Una vez obtenidos los virus portadores de los shRNAs, se infectaron las células A673/TR, se seleccionaron aquellas células resistentes a zeocina (100 µg/ml), y se aislaron cultivos policlonales y monoclonales. Para inducir la expresión de los shARNs (y en consecuencia el silenciamiento del ARNm correspondiente), las células A673/TR/shARNs se incubaron con doxiciclina (1 µg/ml) durante periodos variables de tiempo en función de los experimentos. Los niveles del ARNm de los genes de interés silenciados se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa y Western Blot.

3.4 Establecimiento de líneas de Ewing con expresión ectópica e inducible de LOX, PP-LOX y LOXenz.

El establecimiento de los sistemas celulares con expresión inducible de LOX, PP-LOX y LOXenz, se llevó a cabo mediante el sistema ViraPower™ Lentiviral Expression Systems de Invitrogen. Se utilizaron dos líneas de Ewing que expresaban de forma estable y a elevados niveles el represor de tetraciclina (A673/TR, SK-PN-DW/TR).

Los ADNc de LOX completo, del fragmento que comprende sólo la región propéptido (PP-LOX), así como el ADNc de la enzima madura (LOXenz), se sintetizaron mediante PCR a partir de un ADNc comercial (Origene) clonado en el vector pCMV6-XL5. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar LOX fueron: **LOX F** 5'-GGG GGA TCC CAA TCT GGC AAA AGG AGT GAT GC-3'; **LOX R** 5'-GGG CTC GAG GAA ATT GTG CAG CCT GAG GCA TA-3', para PP-LOX se utilizaron los cebadores **LOX F** y **PP-LOX R** 5'-GGG CTC GAG GTC AGA GTA CTT GTA GGG GTT GTA-3' y para LOX enz se emplearon los cebadores **LOXenz F** 5'-GGG GGA TCC AGA AGT TCC TGC GCT CAG TAA-3' y **LOX R**. En la figura 6 se muestra el tamaño de cada fragmento de LOX, así como los aminoácidos que comprenden.

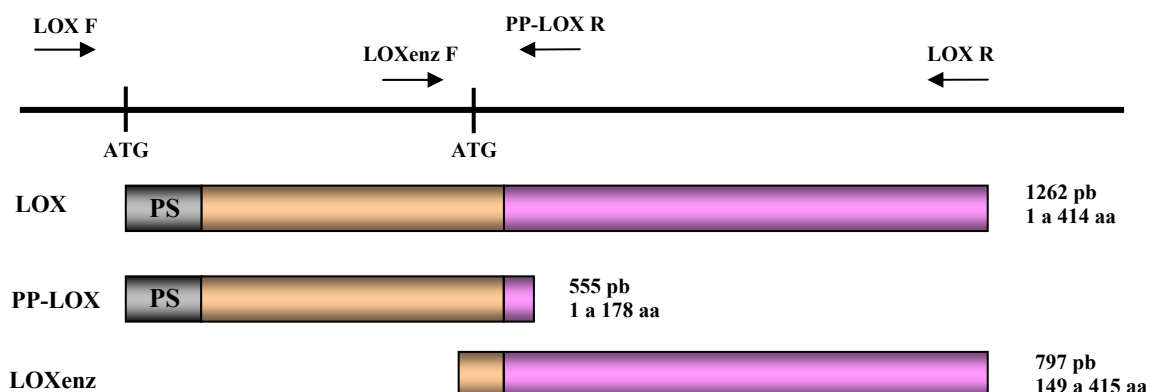


Figura 6. Esquema de los fragmentos de LOX amplificados. Se muestran los cebadores utilizados para amplificar cada una de las regiones de LOX (LOX F-LOX R: LOX, LOX F-PP-LOX R: PP-LOX, LOXenz F-LOX R: LOXenz), así como el tamaño del fragmento amplificado en pares de bases (pb) y los aminoácidos (aa) que comprenden. PS: péptido señal.

Los ADNc de cada región de LOX se clonaron en el vector pENTR2B gracias a las dianas de restricción BamH1 y Xho1 presentes en los cebadores. Tras confirmar la secuencia, se transfirieron los insertos en el vector lentiviral inducible pLenti4-TO-V5-DEST mediante recombinación homóloga. Se confirmó de nuevo la identidad de los genes clonados mediante secuenciación.

Para obtener los lentivirus portadores de los ADNc de interés, se utilizaron células 293 FT (Invitrogen), que se transfectaron con lipofectamina 2000. Para la transfección, se preparó una mezcla compuesta por 9 µg de plásmidos empaquetadores (*ViraPower Packaging Mix*, Invitrogen) y 3 µg del vector de interés (pLenti4-TO-V5-DEST-vacío, -LOX, -PP-LOX y -LOXenz), diluidos en 1,5 ml de medio de cultivo OptiMEM I sin suero. En un tubo aparte, se añadieron 36 µl de lipofectamina 2000 a 1,5 ml de medio OptiMEM I sin suero. Ambos tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron y se incubaron 20 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se prepararon 10 millones de células 293FT en 5 ml de medio OptiMEM I con suero al 10 % y se adicionaron a una placa de cultivo P100. A esta placa se le añadió 5 ml de medio OptiMEM I con suero junto con la mezcla de plásmidos y lipofectamina. La placa se incubó toda la noche a 37°C y al día siguiente se cambió el medio por DMEM suplementado con 10% de suero y 0.1% de aminoácidos no esenciales para mejorar la formación de los virus. A las 48 horas se recogió el sobrenadante con virus, se pasó por un filtro de 0,45 µm, se alicuotó y se congeló rápidamente en nieve carbónica, conservándose a -80 °C hasta el momento de su empleo. Para las infecciones, las células A673/TR y SKPNDW/TR se sembraron a 150.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos, y tras 48 horas se incubaron con 1 ml de sobrenadante viral en presencia de 1 µg/ml de polibreno durante 24 horas. Tras esta

incubación se eliminó el medio y se añadió medio fresco DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino libre de análogos de tetraciclina. A las 48 horas se volvió a añadir medio fresco con el antibiótico adecuado (blastidina a 5 µg/ml para las células infectadas con pLenti6/TR, o zeocina a 100 µg/ml para las infectadas con pLenti4/TO-V5-DEST-vacío, -LOX, -PP-LOX o -LOXenz) y se aislaron cultivos policlonales y monoclonales. Para inducir la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz, las células A673/TR/gen y SK-PN-DW/TR/gen, se incubaron con doxíciclina (1 µg/ml) durante periodos variables de tiempo en función de los experimentos. Los niveles del ARN mensajero de los genes de interés, se determinaron mediante RT-PCR, y los de proteína mediante Western Blot e inmunoprecipitación. Todas las manipulaciones con lentivirus se llevaron a cabo en las instalaciones de nivel de bioseguridad 2 (BL2), exclusivamente por personal autorizado.

3.5. Estudio del mecanismo de regulación de LOX en las células de Ewing.

3.5.1. Estudio del efecto de suramin, IGF-1 y FGF-2 sobre la expresión de LOX en las células de Ewing.

Para analizar el efecto de suramin sobre la expresión de LOX en las células de Ewing, se trataron las células con distintas dosis de suramin (0, 100 y 150 µM) durante 48 horas, tras lo cual se extrajo el ARN total con *TRI-REAGENT* (Sigma), siguiendo el protocolo de la casa comercial. La expresión de LOX se analizó mediante RT-PCR cuantitativa, con una sonda Taqman de Applied Biosystems (explicado más adelante).

Posteriormente se analizó el efecto de los factores de crecimiento IGF-1 (50 ng/ml) y FGF-2 (40 ng/ml) sobre la expresión de LOX, en presencia y ausencia de suramin (150 µM), para lo que se trataron las células durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el ARN total y se realizó RT-PCR cuantitativa.

3.6. Estudios celulares.

3.6.1. Estudios de proliferación celular.

3.6.1.1. Cuantificación del tiempo de duplicación.

Para determinar el efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre el tiempo de duplicación, se sembraron un millón de células en una placa p100 de las líneas celulares correspondientes y se cultivaron en presencia o ausencia de doxíciclina (1µg/ml). A los 3 días, se contó el número de células por placa y se sembraron de nuevo un millón de células, que se

crecieron también en presencia o ausencia de doxyciclina. Este procedimiento se continuó durante 26 días, contando el número de células cada 3 o 4 días. Para calcular el valor medio del tiempo de duplicación se empleó la fórmula horas/nº duplicaciones, en la que el nº de duplicaciones equivale al \log_2 (nº final células/nº inicial células).

3.6.1.2. Cuantificación del crecimiento celular mediante tinción con cristal violeta.

Para los estudios de crecimiento celular en las células A673/TR/LOX, A673/TR/PP-LOX y A673/TR/LOXenz, se sembraron 15.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras 48 horas, se añadió doxyciclina (1 µg/ml) para inducir la expresión de las distintas formas de LOX. El medio con el estímulo se cambió cada 2 o 3 días.

El crecimiento celular se cuantificó finalizado el tiempo de incubación siguiendo un protocolo de tinción con el colorante cristal violeta (Flick and Gifford, 1984) con algunas modificaciones. Las células se fijaron con glutaraldehído al 1% durante 10 minutos, se lavaron con agua, se secaron y se tiñeron con cristal violeta al 0,1 % en agua destilada (v/v) durante 10 minutos. Tras esta incubación, las células se lavaron de nuevo con agua, se secaron, y se liberó el colorante absorbido con ácido acético al 10 % (v/v). Finalmente, se tomó una alícuota de 100 µl y se midió la absorbancia a 450 y 600 nm en un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan). La medida de absorbancia a 450 nm correspondiente al fondo se restó a la de 600 nm.

3.6.1.3. Ensayo de viabilidad celular con CellTiter-Fluor.

También se midió la proliferación utilizando el kit comercial CellTiter-Fluor (Promega). Para ello, se sembraron 3.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de las células correspondientes, en 100 µl de medio. A las 48 horas se añadió doxyciclina (1 µg/ml) o β APN (500 µM), sustituyéndose el medio por medio fresco con doxyciclina o β APN cada 2 días. El número de células viables se cuantificó a los 5 días, para lo que se añadió 100 µl del reactivo CellTiter-Fluor a cada pocillo, se agitó y se incubó 1 hora a 37°C. Se midió la fluorescencia a 390 nm de excitación y 505 nm de emisión, en un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan).

3.6.2. Estudios de citometría de flujo.

La determinación de las diferentes fases del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo con ioduro de propidio (IPr). Se sembraron los clones con mayor expresión de LOX,

LOXenz y PP-LOX, en placas p100. Tras 48 horas de incubación con doxíciclina, las células se procesaron para la detección de las diferentes fases del ciclo celular por citometría de flujo.

Para ello, las células adheridas se recogieron por tripsinización, y se juntaron con las células en suspensión. Después de lavar las células con PBS, se fijaron con etanol al 70° y se dejaron durante un mínimo de 1 hora (máximo de 15 días) a 4 °C. Posteriormente se resuspendieron en una solución de RNasa (100 µg/ml) e IPr (40 µg/ml) en PBS y se incubaron 30 minutos en oscuridad a 37 °C. Se analizaron aproximadamente 20.000 células de cada línea celular en un citómetro FACSCAN (BD Biosciences). Los datos se procesaron con el programa informático WinMDI 2.9.

3.6.3. Estudios de migración a través de membrana.

Para ver el efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz en la migración celular, se pretrataron las células A673/TR/LOX, A673/TR/LOXenz, A673/TR/PP-LOX y A673/TR/empty durante 24 horas con doxíciclina 1µg/ml, en DMEM 0,5% SBF TET (suero bovino fetal libre de tetraciclina, empleado para crecer los modelos celulares de expresión inducible por tetraciclina). Como quimioatrayente se añadieron 3 ml de medio DMEM 10% SBF TET a los pocillos de placas p6 (BD Falcon Companion TC plate), se colocó el inserto (BD Falcon Cell culture Inserts, PET -polietileno tereftalato-, tamaño de poro 8 µm) y se sembraron 300.000 células pretratadas en 2 ml de medio DMEM 0,5% SBF TET sobre el inserto.

Las células se incubaron a 37°C durante 6 horas y se evaluó la migración de las mismas a la parte inferior de la membrana del inserto mediante fijación y tinción en metanol con 0,5% cristal violeta durante 1 hora. Los insertos se lavaron con agua tres veces y se eliminaron las células de la parte superior de la membrana con un bastoncillo. El colorante absorbido por las células adheridas a la parte inferior de la membrana (células migratorias), se liberó con PBS 1x, 2% SDS durante 10 minutos. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan).

3.6.4. Formación de focos de crecimiento en agar blando.

Para los experimentos de formación de focos de crecimiento independiente de anclaje, se prepararon placas p60 con una base de 3 ml de agar noble libre de endotoxinas al 0,5 % (p/v) (Sigma), en medio DMEM/Hepes 1x (15 mM Hepes), suplementado con suero fetal bovino sin

tetraciclina, glutamina (4 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml), fungizona (3 µg/ml) y baycip (25 µg/ml). Esta base de agar impide el anclaje de las células al fondo de la placa. Una vez solidificada, se sembraron 50.000 células por placa resuspendidas en 1,5 ml de agar al 0,3 % (p/v) en medio de cultivo DMEM suplementado con lo ya citado. Las células se incubaron a 37° C durante 4-5 semanas, añadiendo medio fresco (350 µl) cada 2 o 3 días (DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, antibióticos y los estímulos correspondientes). Las colonias se tiñeron con cristal violeta al 0,005 % (p/v) y se tomaron varias fotografías de las placas con aumento 4X. El número y el área de las colonias se cuantificó con el programa ImageJ (Unidad de Microscopía Confocal, Universidad de Barcelona).

3.7. Estudios *in vivo*. Formación de tumores en ratones.

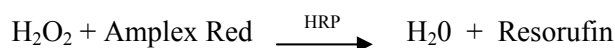
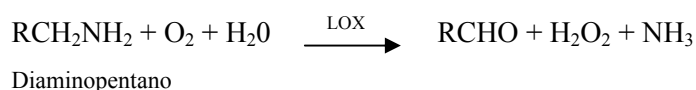
En todos los experimentos se han utilizado ratones desnudos inmunodeprimidos *nu/nu* hembras de 6 semanas (Harlan Ibérica, Barcelona).

En el primer experimento, se inyectaron 5 millones de células A673/TR/PP-LOX c2, A673/TR/PP-LOX c8 y A673/TR/empty c1 resuspendidas e PBS en el flanco derecho de cada ratón y los animales se dividieron en dos grupos; a uno de los grupos se le añadió doxiciclina (1mg/ml) en el agua de bebida, mientras que al otro grupo se le añadió placebo. El agua de bebida se cambió cada 2 o 3 días. Se midió el tamaño de los tumores con un pie de rey y se calculó su volumen con la fórmula $L \cdot A^2 \cdot \pi / 6$ donde L es el largo y A el ancho del tumor. Se siguió la progresión tumoral durante un mes. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor superó un tamaño de 0,5 cm³.

En el segundo experimento, se utilizaron las células A673/TR/PP-LOX c2, A673/TR/PP-LOX c8, resuspendidas en matrigel (BD Biosciences) diluido 1/10 en medio DMEM sin suero. Se inyectaron 5 millones de células en el flanco derecho de cada ratón, y cuando los animales desarrollaron un tumor de tamaño aproximado de 50 mm³, se dividieron en dos grupos; a uno de los grupos se le añadió doxiciclina (1 mg/ml) en el agua de bebida, mientras que al otro grupo se le añadió placebo. Cada 2 o 3 días se cambió el agua de bebida y se midió el tamaño tumoral con la fórmula $L \cdot A^2 \cdot \pi / 6$. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor superó un tamaño de 0,5 cm³.

3.8. Cuantificación de la actividad enzimática de LOX con Amplex Red.

Para medir la actividad enzimática de LOX se empleó un ensayo fluorimétrico, que utiliza 1,5-diaminopentano como sustrato de LOX, de manera que el peróxido de hidrógeno liberado en la catálisis es detectado en una reacción en la que intervienen el reactivo comercial Amplex Red y HRP (*horseradish peroxidase*). La *horseradish* peroxidasa utiliza el H_2O_2 para oxidar el Amplex Red dando un compuesto denominado Resorufín, que es fluorescente. La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Para llevar a cabo estos estudios, se sembraron en p60, 300.000 células A673/TR/LOXenz por placa, y se crecieron en medio DMEM sin rojo fenol, para no interferir con el reactivo Amplex Red. Al día siguiente las células se trataron con doxyciclina a $1\mu\text{g/ml}$, utilizándose como control células sin tratar. A las 72 horas de tratamiento, se recogió por un lado el medio y por otro lado el lisado celular resultante de someter a las células recogidas con $500\mu\text{l}$ de PBS y $10\mu\text{l}$ de PMSF $0,1\text{ M}$, a 10 ciclos de congelación/descongelación en N_2 líquido y agua a 37°C .

El ensayo de actividad se realizó en placas de 96 pocillos, añadiendo $90\mu\text{l}$ de muestra y $10\mu\text{l}$ de BAPN ($500\mu\text{M}$) o $10\mu\text{l}$ de agua destilada, y $100\mu\text{l}$ de la mezcla de reacción de Amplex Red, que consiste en urea ($1,2\text{M}$), ácido bórico ($\text{pH } 8,2$, 50 mM), Amplex Red ($50\mu\text{M}$), *horseradish* peroxidada ($0,1\text{ U/ml}$) y 1,5-diaminopentano (10 mM). La fluorescencia se determinó cada 10 minutos, durante 4 horas, con una longitud de onda de excitación de 544 nm y de emisión de 590 nm , en un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan).

3.9. Estudios de expresión génica.

3.9.1. RT-PCR y RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo en un volumen final de $20\mu\text{l}$, conteniendo $1\mu\text{g}$ de ARN, 1 mM dNTPs, 10 mM DTT, $2,5\mu\text{M}$ cebadores hexámeros (Promega) y tampón de transcripción reversa 1x. Esta mezcla se incubó 10 minutos a 70°C para desnaturalizar el ARN y se enfrió en hielo. Finalmente se añadieron $2\text{ U}/\mu\text{l}$ inhibidor de RNasas (RNasin, Promega) y

10 U/μl transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen). La reacción se incubó 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, y finalmente 5 minutos a 95 °C. Como controles negativos se incluyeron muestras en las que se omitió la enzima transcriptasa reversa.

La PCR convencional se realizó en un volumen de 20 μl, conteniendo 400 μM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 300 nM cebadores, 0,5 U/μl Taq polimerasa (Biotools) y tampón de reacción 1x. El programa de PCR consistió en: 5 minutos a 95 °C seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C y 30 segundos a 54 °C. Los cebadores utilizados en la PCR convencional para la detección de los diferentes miembros de la familia LOX se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Cebadores utilizados para la detección del ARN mensajero de los miembros de la familia LOX.

Gen	Cebadores
LOX	LOX F GTTTATTATTTACATCACTTTGTGA LOX R AAGTTTCAGTTCAAAGTCATTTTG
LOXL1	LOXL1 F CTTGAAATGCTGTCATCGGAGGA LOXL1 R ACCCCTCTGCAGAGGCCT
LOXL2	LOXL2 F TCTTCTCCAGTGACACGTGGA LOXL2 R ACGTGGCACCATTATCTATGTGAC
LOXL3	LOXL3 F ATTCTTCAGAGCCCAGGAGTCA LOXL3 R AGTATGAGGCTCCTGCTCTGAT
LOXL4	LOXL4 F ACCAACAGTTACGGAGTGCTTG LOXL4 R TATTTCTTGGCAGAGGCCCT

La PCR cuantitativa (usando sondas Taqman) se realizó en un volumen final de 20 μl, conteniendo 800 μM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 1μl solución cebadores/sonda Taqman (Applied Biosystems), 0,5 U Taq polimerasa (Biotools) y tampón de reacción 1x. El programa de PCR consistió en: 2 minutos a 95 °C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 50 segundos a 60 °C. En todos los ensayos se amplificó en paralelo el ARN mensajero del gen TBP (*TATA binding protein*), que se utilizó como referencia interna para la normalización de los niveles de expresión del resto de los genes. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un aparato de PCR cuantitativa modelo RotorGene 3000 (Corbett Research). La secuencia de los cebadores y sondas Taqman empleadas se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Cebadores y sondas Taqman utilizadas para la cuantificación de los ARN mensajeros de los genes TBP, EWS/FLI1 y LOX.

Gen	Cebadores-sonda Taqman
TBP	Sonda Taqman 5' FAM-CTGCCACCTTACGCTCAGGGCTTGG-TAMRA 3' TBP-F2 5' GAACATCATGGATCAGAACAACAG 3' TBP-R2 5' ATT GGT GTTCTGAATAGGCTGTG 3'
EWS/FLI1	Sonda Taqman 5' TET-AAC AGAGCAGCAGCTACGGGCAGCA-TAMRA 3' EWS-F2 5' AGCCAAGCTCCAAGTCAATATAG 3' FLI1-R3 5' TCCTCTTCTGACTGAGTCATAAG 3'
LOX	Sonda Taqman Hs00942480_m1 (Applied Biosystems)

También se realizó la PCR cuantitativa con sondas UPL (Universal Probe Library, Roche), en un volumen final de 10 µl, conteniendo 200 nM de cebadores y 100 nM de sonda UPL. El programa de PCR consistió en: 10 minutos a 95 °C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. La secuencia de los cebadores y sondas UPL utilizadas se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Cebadores y sondas UPL utilizadas para la cuantificación de los ARN mensajeros de los miembros de la familia LOX y TBP.

Gen	Sonda UPL	Cebadores
LOX	82	F 5' TGGCACAGTTGTCATCAACA 3' R 5' ACTTGCTTTGTGGCCTTCAG 3'
LOXL1	64	F 5' GCATGCACCTCTCATACCC 3' R 5' CAGTCGATGTCCGCATTGTA 3'
LOXL2	7	F 5'ACTGCCAGCTCCTCCTACG 3' R 5'TCGTTGCCAGTACAGTGGAG 3'
LOXL3	81	F 5' GGACCCACAGTGCCAAAT 3' R 5' CTGCAGCTCAAGTTGTCCAG 3'
LOXL4	43	F 5'CCAGCTTCTGTCTGGAGGAC 3' R 5' AAGTTGGCACATGCGTAGC 3'
TBP	3	F 5' GCTGGCCCATAGTGATCTTT 3' R 5' CTTACACGCCAAGAAACAGT 3'

El nivel de expresión de cada gen se normalizó frente al control interno (TBP). Para cada gen se obtuvieron los datos de Ct (*Cycle Threshold*, ciclo en el que los productos de PCR inician la fase exponencial de la amplificación), usando un programa específico (*RotorGene versión 6.0*). Para comparar los niveles de expresión de un mismo gen en dos muestras diferentes se usó el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak et al., 2001). En primer lugar se calculó el valor de ΔCt de la muestra que queremos analizar y de la muestra control usando la fórmula $\Delta Ct = Ct_{\text{gen muestra problema}} - Ct_{\text{TBP}}$. Posteriormente se calculó el valor $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$. El valor del cociente (veces de incremento o inhibición) entre las dos muestras se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.9.2. Extracción de proteína nuclear y total.

Para la extracción de proteína nuclear, las células se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en PBS a razón de un millón de células por ml y se lisaron con tampón C1 (1,28

M sacarosa, 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 4% Tritón X-100) suplementado con PMSF (1 mM).

Para la extracción de proteína total, las células se lavaron dos veces con PBS 1x y se lisaron con solución RIPA (PBS 1x, 1% Nonidet p40, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolato sódico) suplementada con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aprotinina 62 µg/ml, EDTA 1 mM, pirofosfato sódico pH 7,4 10 mM, ortovanadato sódico 0,1 mM y fluoruro sódico 10 mM).

3.9.3. Inmunoprecipitación.

La detección de PP-LOX se realizó en el sobrenadante del cultivo de las células A673/TR/PP-LOX, al tratarse de una proteína presente en el medio extracelular. Se partió de 15 ml de medio, que se concentraron en un volumen final de 1 ml con los filtros Amicon Ultra 10K (Millipore).

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se utilizó proteína A, que se lavó tres veces con PBS antes de usarla. Se añadieron 25 µl de proteína A, ya lavada, a 1-1,5 ml de medio que también contenía 10-15 µl PMSF (0,1 M). Tras incubar 1 hora a 4°C en agitación (para prelavado el medio de proteínas que se puedan unir inespecíficamente a la proteína A), se centrifugó 10 minutos y se recogió el sobrenadante. A continuación se añadió el anticuerpo anti-V5 en cantidad saturante (1 µg) y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se añadió 25 µl de proteína A y se incubó 1-4 horas con agitación a 4 °C. Se centrifugó 10 minutos, descartando el sobrenadante. Se lavó el precipitado dos veces con PBS, 1 mM PMSF, 0,5% Tritón X-100 y se resuspendió finalmente en tampón de carga SDS. Se incubó 5 minutos a 100 °C (para desnaturalizar la proteína y separarla de la proteína A) y se centrifugó, cargando el sobrenadante en el gel de electroforesis. Las inmunoprecipitaciones se hicieron en paralelo con dos controles negativos, la muestra sin incubación con ningún anticuerpo y la muestra incubada con un anticuerpo anti-tubulina.

3.9.4. Western Blot.

La concentración de proteínas se determinó con el método del ácido bicinonínico (BCA, Pierce), en un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan). Posteriormente, se cargaron entre 5-20 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida vertical al 10% o 12,5% (acrilamida: bisacrilamida 37,5:1) y se sometieron a electroforesis a 80 V. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Pall) usando un método semiseco (*Trans-*

Blot SD Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell Instruction Manual, Bio-Rad Laboratories (1988)) a un amperaje constante de 3 mA por cm². El bloqueo y los lavados de la membrana se hicieron con tampón TTBS (TBS 1x (tampón salino con Tris 20 mM, NaCl 136 mM, pH 7,5) y Tween 20 0,5 %)). Según el anticuerpo utilizado, se bloqueó en leche desnatada al 5% o en BSA (Albumina de suero bovino) también al 5%. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios a las diluciones indicadas: anti-FLI1 policlonal de conejo (1:300, Santa Cruz), anti-tubulina monoclonal de ratón (1:3.500, Sigma), anti-Akt policlonal de conejo (1:1.000, Cell Signaling), anti-P-Akt (ser473) policlonal de conejo (1:1.000, Cell Signaling), anti-Erk policlonal de ratón (1:1.000, Cell Signaling), anti-P-Erk policlonal de conejo (1:1.000, Cell Signaling), anti-V5 monoclonal de ratón (1:1000, Invitrogen) y anti-TeT-R policlonal de conejo (1:1.000, MoBiTec). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de ratón (1:5.000, Santa Cruz) y anti-IgG de conejo (1:7.500, Santa Cruz), acoplados todos ellos a HRP (Peroxidasa de rábano picante). Después de la incubación con los anticuerpos, se hicieron 4 lavados de 15 minutos cada uno en TTBS 1x. Las proteínas se visualizaron con el sistema de detección ECL (Amersham) y se expusieron en películas de autoradiografía. Las películas se revelaron, se escanearon y se cuantificaron las bandas con el programa ImageJ (Unidad de Microscopía Confocal, Universidad de Barcelona).

Las membranas se hibridaron con otros anticuerpos tras tratarlas durante 30 minutos a 65 °C con una solución compuesta por SDS 10% (p/v), β-mercaptoetanol 5 mM y Tris HCl 50 mM pH 8,8.

3.9.5. Inmunofluorescencia.

Para localizar la expresión de cada una de las regiones de LOX a nivel celular, se hizo un ensayo de inmunofluorescencia con las líneas A673/TR/LOX, A673/TR/LOXenz, A673/TR/PP-LOX y A673/TR/vacio.

Para ello, se sembraron 50.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos, sobre cristales redondos y esterilizados de 12 mm. Después de 48 horas en presencia de doxíciclina para estimular la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz, se fijaron las células con metanol absoluto (-20°C) durante 15 minutos. Tras lavar dos veces con PBS, se incubaron 30 minutos a 37 °C, con 300 µl/pocillo de la solución de bloqueo, que consiste en 5% v/v de suero de cabra por cada ml de PBS y Tritón X-100 al 0,1%. A continuación se incubó cada cristal con 20 µl de la solución del anticuerpo primario anti-V5 (1% v/v de suero de cabra por cada ml de PBS y

Tritón X-100 al 0,1%, anti-V5 1/300), durante una hora, a 37 °C y en oscuridad. Se lavaron tres veces con PBS y se incubaron de nuevo con 20 µl por cristal de la solución del anticuerpo secundario (1% v/v de suero de cabra por cada ml de PBS y Tritón X-100 al 0,1%, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 1/1000, anti-mouse FITC 1/500), durante 50 minutos, a 37°C y en oscuridad. Tras lavar tres veces con PBS, se montaron los cristales con Mowiol sobre portaobjetos y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Axio Imager A1 (Zeiss).

3.10. Análisis estadístico

Para la comparación de dos grupos, se usó el test T de Student de dos colas. Para la comparación del tamaño tumoral entre el grupo control y el tratado, se usó un test de ANOVA de dos variables basado en el método Student-Newman-Keuls. Las diferencias en la aparición del tumor se analizaron con el test de *log-rank*. Para todos los análisis, se consideraron diferencias significativas aquellas con $P < 0,05$. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar o media \pm error estándar de la media.

4. Resultados

4.1. Lisil oxidasa (LOX) es un gen diana de la oncoproteína EWS/FLI1.

4.1.1. Establecimiento de modelos celulares de expresión inducible de ARN de interferencia de EWS/FLI1 en células de Ewing.

Con el objetivo de identificar genes potencialmente regulados por EWS/FLI1, se estableció en nuestro laboratorio un modelo celular inducible de ARN de interferencia de EWS/FLI1. Para establecer este modelo, se eligió el sistema lentiviral H1 BLOCK-iT™ de Invitrogen, en el que la expresión de los shRNAs (small hairpin RNAs) puede ser controlada mediante la adición de doxiciclina (un análogo de la tetraciclina) al medio de cultivo. De esta manera, al inducir la expresión del shRNA, se reducen los niveles del ARN mensajero del gen correspondiente.

El procedimiento experimental consistió en infectar la línea celular de Ewing A673 con lentivirus que contenían un vector de expresión del represor de la tetraciclina (pLenti6/TR). Estas células, denominadas A673/TR, fueron infectadas a continuación con lentivirus portadores de un vector de expresión con el shRNA de EWS/FLI1 (Figura 7) y se aislaron los clones con mayor inhibición de EWS/FLI1. Como células control se emplearon células A673 infectadas con un vector conteniendo un shRNA dirigido contra la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). Al añadir doxiciclina al medio de cultivo, se induce la expresión del shRNA correspondiente, obteniéndose una disminución del 93% de los niveles del ARNm de EWS/FLI1 en la línea de Ewing A673. Los cambios observados en los niveles de expresión del ARN mensajero de EWS/FLI1 tuvieron su correspondiente reflejo en los niveles de proteína, alcanzándose una inhibición del 99% (Figura 8).

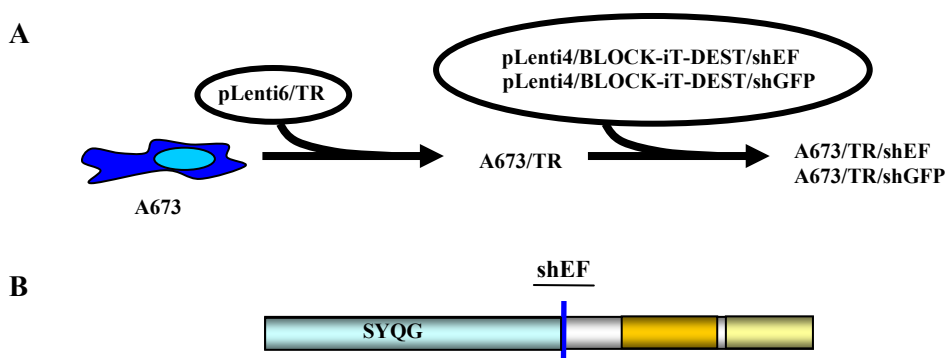


Figura 7. Sistema inducible de expresión de shRNAs dirigidos contra EWS/FLI1 en células de Ewing. **A)** La línea celular de Ewing A673 se infectó con lentivirus que portaban el represor de la tetraciclina (TR). Los clones con mayor expresión de TR se infectaron con lentivirus portadores de los shRNAs de interés. El represor de tetraciclina impide la expresión del ARN de interferencia. Al añadir doxiciclina, un análogo de la tetraciclina, el represor cambia de conformación, separándose del promotor y permitiendo así la expresión del shRNA correspondiente. **B)** Localización del ARN de interferencia utilizado contra EWS/FLI1, dirigido contra la zona de fusión de los genes *EWS* y *FLI1* (shEF).

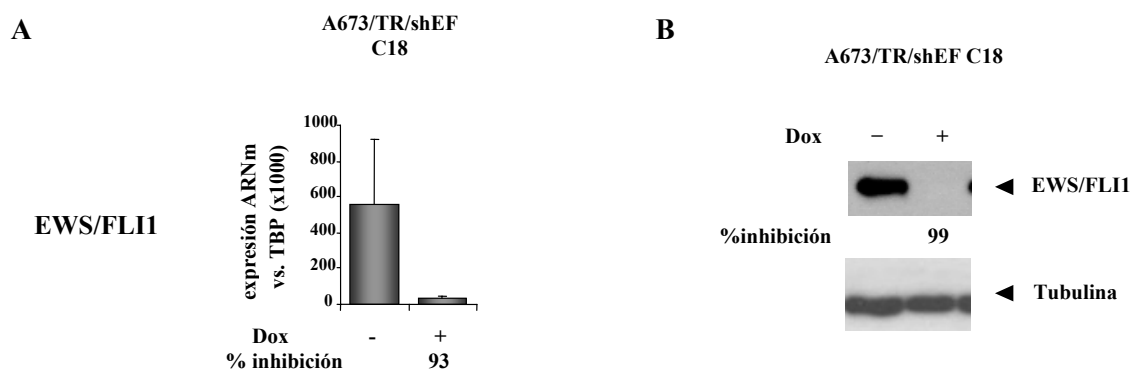


Figura 8. Silenciamiento de EWS/FLI1 en las células A673/TR/shEF. A) Cuantificación de los niveles de ARN mensajero de EWS/FLI1 mediante RT-PCR cuantitativa. Media \pm desviación estándar de dos experimentos por duplicado. **B)** Determinación de los niveles de EWS/FLI1 a nivel de proteína mediante Western Blot. El silenciamiento de EWS/FLI1 en las células A673/TR/shEF (clon 18) produce una disminución prácticamente total de EWS/FLI1. Dox, doxiciplina.

Dado el elevado grado de inhibición de EWS/FLI1 obtenido en las células de Ewing A673, utilizamos varios clones (tres) que mostraban porcentajes de inhibición similares, para identificar genes regulados por EWS/FLI1 en células de Ewing. Para ello se realizaron estudios de expresión con matrices de oligonucleótidos en células A673 que expresaban elevados niveles de EWS/FLI1 (A673/TR/shGFP) y en células en las que la expresión de EWS/FLI1 había sido silenciada (A673/TR/shEF, cultivadas en presencia de doxiciplina). En las tablas IX y X se muestra la lista de los veinte genes más reprimidos o inducidos por EWS/FLI1. Algunos de estos genes, como CCK y DAX1 (N0B1), han sido ya estudiados por nuestro grupo (Carrillo et al., 2007; García-Aragoncillo et al., 2008; Mendiola et al., 2006).

En esta tesis, nos centraremos en el estudio de la enzima Lisil Oxidasa (LOX), uno de los genes que mostró una fuerte represión por EWS/FLI1 en estos estudios de expresión.

Tabla IX. Lista de los 20 genes más reprimidos por EWS/FLI1 en la línea celular de Ewing A673. El ratio EF/GFP representa el cociente entre los valores de expresión del gen, en ausencia de EWS/FLI1 (células A67/TR/shEF, cultivadas en presencia de doxiciclina), en comparación con los valores obtenidos en las células A673/TR/shGFP.

Sonda	Acc:NCBI	Nombre	Localización cromosómica	Símbolo	EF/GFP ratio	EF/GFP T Test
GE80964	NM_000900	Matrix Gla protein	12p13.1-p12.3	MGP	171,98	0,00218
GE81041	NM_001553	Insulin-like growth factor binding protein 7	4q12	IGFBP7	61,11	0,00983
GE56275	NM_015430	Regeneration associated muscle protease	11p13	DKFZP586H2123	46,99	0,00216
GE54355	NM_005841	Sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)	4q28.1	SPRY1	45,98	0,00029
GE79481	NM_002852	Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	3q25	PTX3	38,84	0,00658
GE57073	NM_006475	Periostin, osteoblast specific factor	13q13.3	POSTN	37,66	0,00003
GE54521	NM_000599	Insulin-like growth factor binding protein 5	2q33-q36	IGFBP5	35,20	0,00000
GE57506	NM_001854	Collagen, type XI, alpha 1	1p21	COL11A1	29,01	0,01644
GE86121	NM_000599	Insulin-like growth factor binding protein 5	2q33-q36	IGFBP5	25,15	0,00000
GE62938	NM_001657	Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	4q13-q21	AREG	24,78	0,00155
GE61964	NM_005651	Tryptophan 2,3-dioxygenase	4q31-q32	TDO2	23,86	0,00141
GE54690	NM_004887	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	5q31	CXCL14	21,77	0,00001
GE59766	NM_004369	Collagen, type VI, alpha 3	2q37	COL6A3	21,42	0,00001
GE81145	NM_002317	Lysyl oxidase	5q23.2	LOX	21,16	0,00002
GE85799	AK091349	Hypothetical gene supported by AK023162	9q34.3	LOC90120	20,75	0,12230
GE82784	NM_006255	Protein kinase C, eta	14q22-q23	PRKCH	19,80	0,00017
GE87326	NM_138455	Collagen triple helix repeat containing 1	8q22.3	CTHRC1	17,81	0,02187
GE514985	NM_005092	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	1q23	TNFSF18	17,19	0,01597
GE899803	AK125591	Interleukin 17 receptor D	3p14.3	IL17RD	15,63	0,00009
GE79387	NM_002775	HtrA serine peptidase 1	10q26.3	HTRA1	15,12	0,00515

Tabla X. Lista de los 20 genes más inducidos por EWS/FLI1 en la línea celular de Ewing A673. El ratio EF/GFP representa el cociente entre los valores de expresión del gen, en ausencia de EWS/FLI1 (células A673/TR/shEF, cultivadas en presencia de doxiciclina), en comparación con los valores obtenidos en las células A673/TR/shGFP.

Sonda	Acc:NCBI	Nombre	Localización cromosómica	Símbolo	EF/GFP ratio	EF/GFP T Test
GE58231	NM_000729	Cholecystokinin	3p22-p21.3	CCK	0,04	0,00000
GE884458	BM041161	Actin binding LIM protein family, member 2	4p16-p15	ABLIM2	0,05	0,00000
GE764531	NM_005950	Metallothionein 1G	16q13	MT1G	0,07	0,00000
GE59954	NM_003970	Myomesin (M-protein) 2, 165kDa	8p23.3	MYOM2	0,08	0,00000
GE59196	NM_006741	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	12q13.2	PPP1R1A	0,08	0,00000
GE574331	NM_198179	G protein-coupled receptor 103	4q27	GPR103	0,10	0,00000
GE81866	NM_199329	Solute carrier family 43, member 3	11q11	SLC43A3	0,10	0,00000
GE80049	NM_145792	Microsomal glutathione S-transferase 1	12p12.3-p12.1	MGST1	0,11	0,00000
GE715818	AW304028	Lipoxygenase homology domains 1	18q21.1	LOXHD1	0,11	0,00000
GE61164	NM_199167	Clusterin-like 1 (retinal)	18p11.32	CLUL1	0,11	0,00000
GE836683	AK127059	Chromosome 21 open reading frame 67	21q22.3	C21orf67	0,12	0,00001
GE62829	NM_000475	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	Xp21.3-p21.2	NR0B1	0,12	0,00000
GE766175	NM_152327	Poly(A) polymerase alpha	14q32.31	PAPOLA	0,13	0,00000
GE494767	AL832586	Family with sequence similarity 123A	13q12.13	FAM123A	0,14	0,00000
GE596520	NM_173508	Solute carrier family 35, member F3	1q42.2	SLC35F3	0,15	0,00000
GE79171	NM_030763	Nucleosomal binding protein 1	Xq13.3	NSBP1	0,17	0,00000
GE57203	NM_014881	DNA cross-link repair 1A (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	10q25.1	DCLRE1A	0,17	0,00000
GE88270	NM_005239	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	21q22.3 21q22.2	ETS2	0,17	0,00000
GE479051	NM_000306	POU domain, class 1, transcription factor 1 (Pit1, growth hormone factor 1)	3p11	POU1F1	0,18	0,00000
GE62878	NM_005472	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	11q13-q14	KCNE3	0,18	0,00000

4.1.2. EWS/FLI1 reprime la expresión de LOX.

De acuerdo con los experimentos de expresión génica llevados a cabo con matrices de oligonucleótidos, LOX está reprimido por EWS/FLI1, ya que al inducir la expresión del ARN de interferencia de EWS/FLI1 con doxíciclina y por tanto reducir los niveles de EWS/FLI1, la expresión de LOX aumenta. La matriz de oligonucleótidos utilizada en estos estudios contenía también sondas para el resto de los miembros de la familia de proteínas LOX, por lo que además decidimos analizar el efecto de la inhibición de EWS/FLI1 sobre la expresión de estos genes. Como se puede observar en la tabla XI, los niveles de represión por parte de EWS/FLI1 son menores en el resto de los miembros de la familia de proteínas LOX.

Tabla XI. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre los niveles de expresión de los miembros de la familia de proteínas LOX. El ratio EF/GFP representa el cociente entre los valores de expresión del gen, en ausencia de EWS/FLI1 (células A673/TR/shEF, cultivadas en presencia de doxíciclina) en comparación con los valores obtenidos en las células A673/TR/shGFP.

Sonda	Acc:NCBI	Nombre	Localización cromosómica	Símbolo	EF/GFP ratio	EF/GFP T Test
GE81145	NM_002317	Lysyl oxidase	5q23.2	LOX	21,16	0,00002
GE61513	NM_005576	Lysyl oxidase-like 1	15q24-q25 15q22	LOXL1	3,43	0,00001
GE59532	NM_002318	Lysyl oxidase-like 2	8p21.3-p21.2	LOXL2	7,92	0,00029
GE79689	NM_032603	Lysyl oxidase-like 3	2p13	LOXL3	8,48	0,00009
GE87704	NM_032211	Lysyl oxidase-like 4	10q24	LOXL4	1,51	0,01829

A continuación, confirmamos estos datos mediante RT-PCR y RT-PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos confirman los datos de las matrices de oligonucleótidos, ya que al añadir doxíciclina al medio de cultivo y reducir por tanto los niveles de EWS/FLI1, la expresión de LOX aumenta (Figura 9). En el resto de los miembros de la familia de proteínas LOX, el aumento de expresión en ausencia de EWS/FLI1 es más leve, siendo más visible en el caso de LOXL2 y LOXL4 (Figura 9). Los datos obtenidos de estos experimentos indican por tanto que la expresión de la enzima Lisil Oxidasa (LOX) es reprimida por EWS/FLI1 en la línea celular de Ewing A673, y también es reprimida, aunque en menor medida, la expresión del resto de proteínas de la familia LOX.

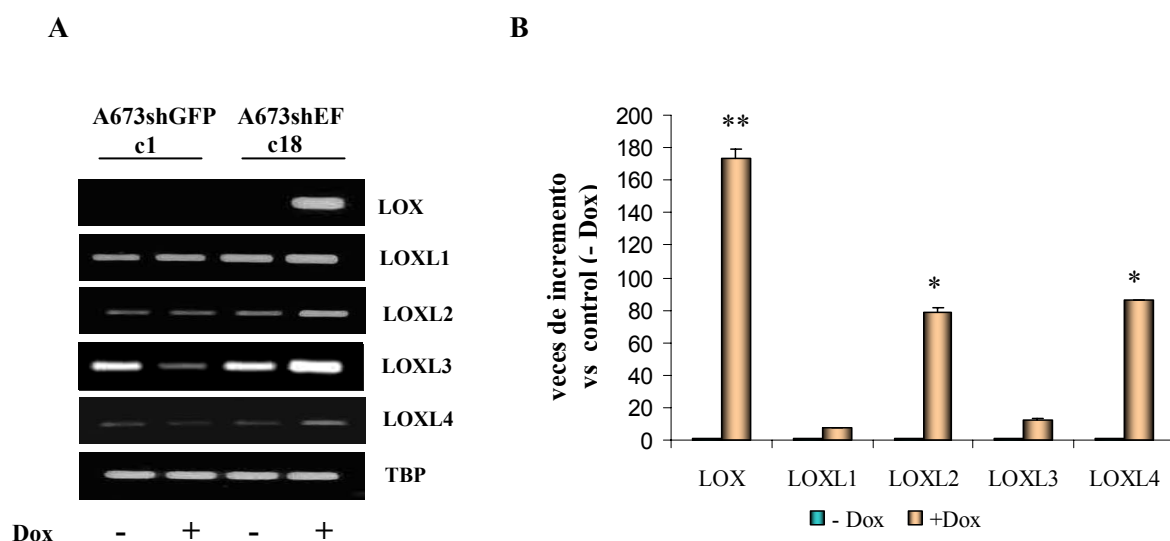


Figura 9. Efecto del silenciamiento de EWS/FLI1 sobre la expresión de los miembros de la familia de proteínas LOX en las células A673, analizado mediante RT-PCR y RT-PCR cuantitativa. A) Transcurridas 48 horas tras la adición de doxyciclina para inducir la expresión del ARN de interferencia de EWS/FLI1, comprobamos mediante RT-PCR que la expresión de LOX aumenta en la línea A673shEF. También se observa aumento en la expresión de LOXL2 y LOXL4. TBP (*TATA Binding Protein*) se emplea como control de carga. **B)** Cuantificación de los niveles de ARN mensajero de LOX y del resto de LOXL mediante RT-PCR cuantitativa, utilizando la sonda UPL (*Universal Probe Library*) 82 de Roche. Datos normalizados frente a TBP y frente a los valores de expresión en ausencia de doxyciclina. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo por duplicado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$ versus células cultivadas en ausencia de doxyciclina (prueba T de student).

También analizamos mediante RT-PCR la expresión de LOX y de las proteínas LOXL en otras líneas celulares de Ewing (Figura 10A). No detectamos expresión de LOX en la mayoría de ellas, siendo la única excepción la línea celular SKNMC. Las líneas celulares 293 y HeLa nos sirven como control positivo, ya que expresan LOX a elevados niveles. En cuanto al resto de miembros de la familia de proteínas LOX, la expresión varía en función de la línea celular, LOXL1 es expresado por las líneas de Ewing RDES, A4573, SKPNDW y A673, LOXL2 por las líneas RDES, TTC466, A4573 y SKNMC, y todas las líneas de Ewing, así como las células HeLa y 293, expresan LOXL3 y LOXL4, con la excepción de TTC466 y SKPNDW en el caso de LOXL4.

Debido a que el miembro de la familia de proteínas LOX que presenta mayor nivel de regulación por parte de EWS/FLI1 es LOX, centraremos nuestros estudios en él. Por tanto, confirmamos los datos de expresión de LOX en las líneas celulares de Ewing mediante RT-PCR cuantitativa, al mismo tiempo que analizamos su expresión en otras líneas celulares tumorales y en fibroblastos (Figura 10 B), los cuales nos servirán como control positivo de expresión de LOX, ya que la enzima lisil oxidasa es expresada y secretada por células fibroblásticas (Kagan and Li, 2003).

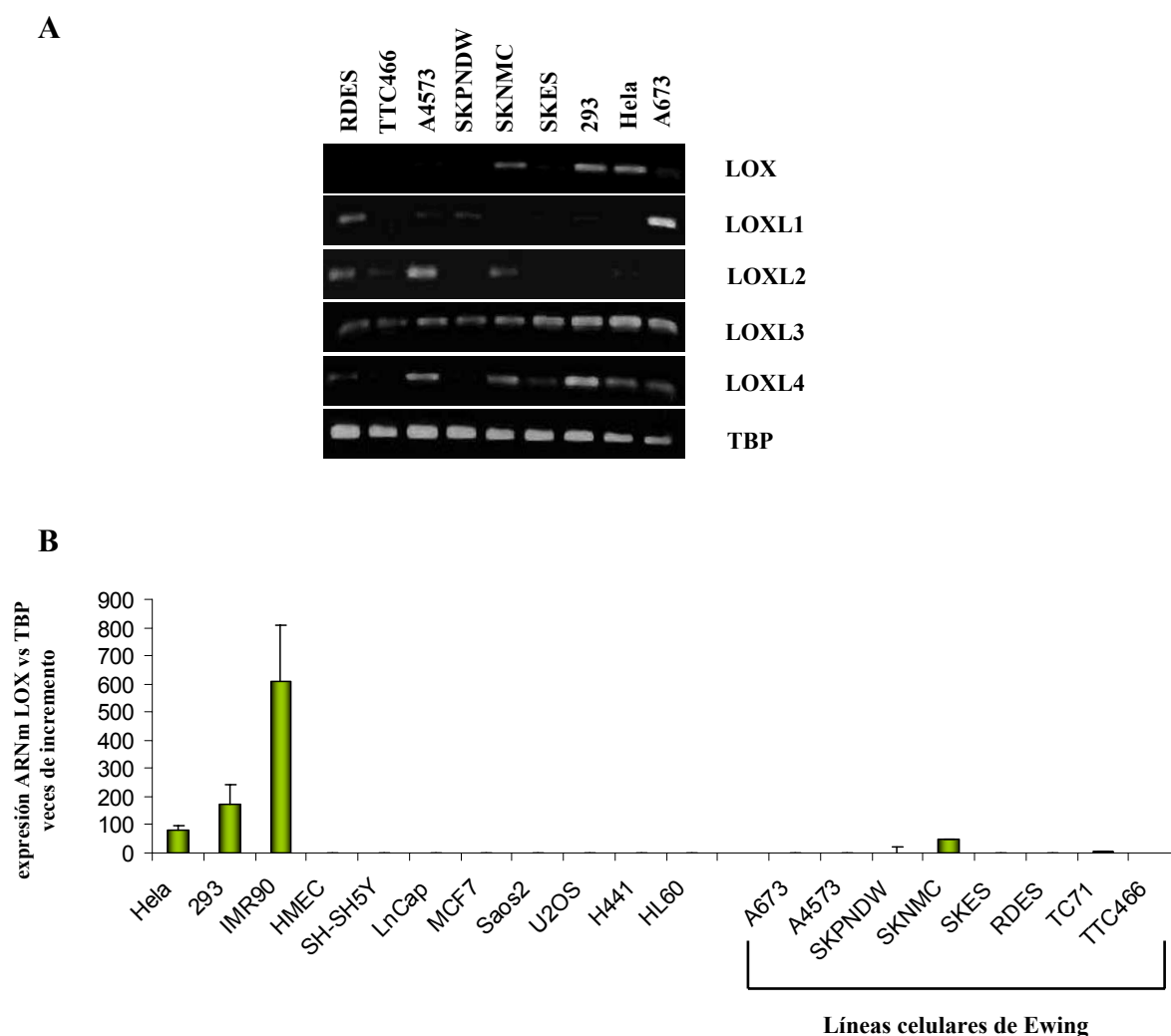


Figura 10. Análisis de la expresión de LOX mediante RT-PCR y RT-PCR cuantitativa. A) Análisis mediante RT-PCR de la expresión de los miembros de la familia de proteínas LOX en las células de Ewing. Las líneas celulares HeLa y 293 se emplean como control positivo de expresión de LOX. TBP se emplea como control de carga. **B)** Cuantificación de los niveles de ARN mensajero de LOX en las células de Ewing y en otras líneas celulares, mediante PCR cuantitativa, utilizando la sonda UPL 82 de Roche. Los datos de expresión de LOX se normalizan frente a TBP. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo por duplicado. Además de las células de Ewing, se analizan las siguientes líneas celulares: HeLa, 239, epiteliales; IMR90, fibroblastos de pulmón humano fetal; HMEC, endoteliales; SH-SH5Y, neuroblastoma; LnCap, cáncer de prostata humano; MCF7, cáncer de mama humano; Saos2, U2OS, osteosarcoma; H441, adenocarcinoma de pulmón; HL60, leucemia.

Comprobamos que el nivel de expresión de LOX en las líneas tumorales que hemos analizado es muy bajo, lo que indica el posible papel de LOX como supresor tumoral en dichas células. Sin embargo, y como era esperable, su expresión es muy elevada en los fibroblastos IMR90.

También analizamos la expresión de LOX mediante RT-PCR cuantitativa en muestras de tumor de Ewing, y observamos que su expresión es muy baja en la mayoría de las muestras analizadas (Figura 11).

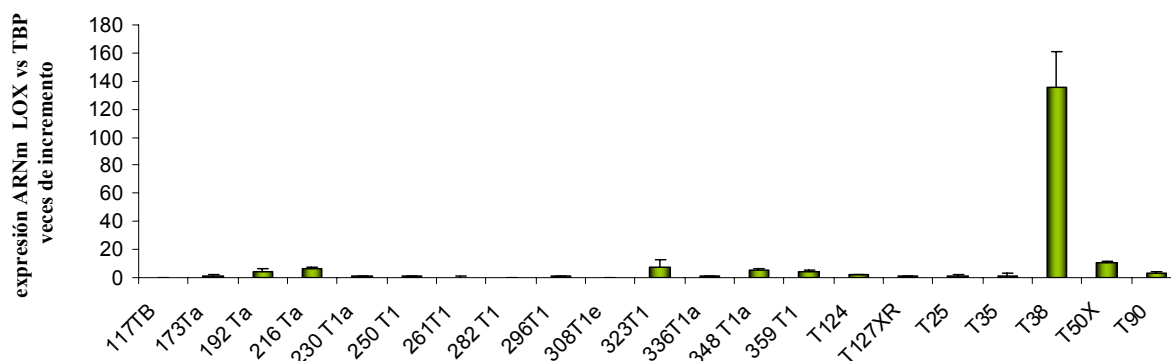


Figura 11. Análisis de la expresión de LOX en tumores de Ewing, mediante RT-PCR cuantitativa. Se analiza la expresión de LOX a nivel de ARN mensajero, en diversas muestras de tumor de Ewing. Se emplea la sonda UPL 82 y se normalizan los valores frente a TBP. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo por duplicado.

En cuanto a la expresión de LOX en tejidos, el que presenta mayor expresión de LOX, analizado mediante RT-PCR cuantitativa, es la placenta, si bien también se expresa en menor medida en tejido adiposo, vejiga, corazón, pulmón, ovario, músculo esquelético, esófago, riñón y tráquea (Figura 12). Según la bibliografía, anteriormente ya se había detectado expresión de LOX en placenta humana, piel, pulmón, corazón y riñón (Baccarani-Contrí et al., 1989; Molnar et al., 2003).

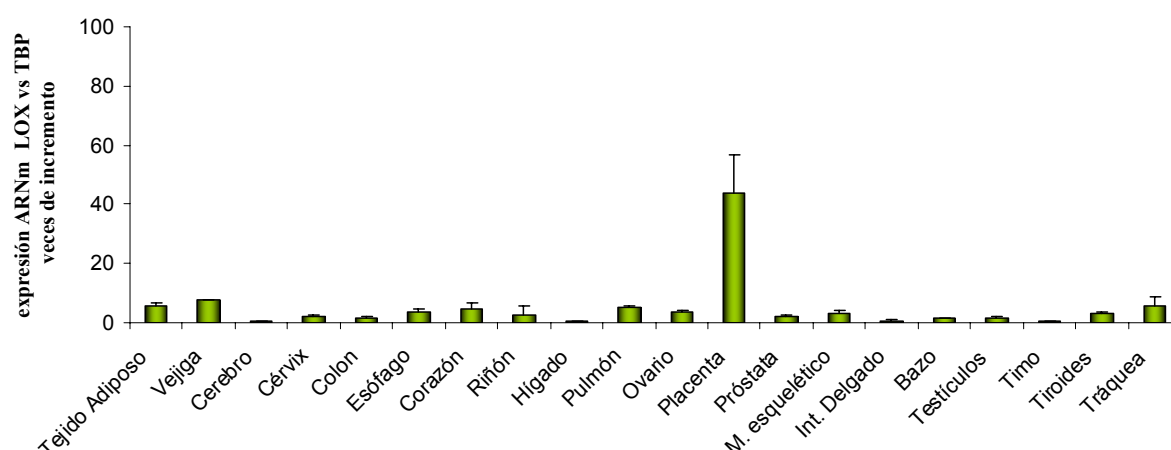


Figura 12. Análisis de la expresión de LOX en distintos tejidos humanos, mediante RT-PCR cuantitativa. A partir de ARN procedente de distintos tejidos humanos, se analiza la expresión de LOX, para lo que se usa la sonda UPL 82. Los datos se normalizan frente a TBP. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo por duplicado.

Como hemos observado, de todos los miembros de la familia de proteínas LOX, el que presenta mayor nivel de represión por parte de EWS/FLI1 es LOX, por lo que éste miembro de la familia LOX será el objetivo de estudio en esta tesis.

4.2. Mecanismos de regulación de LOX en las células de Ewing.

4.2.1. La regulación de LOX por parte de EWS/FLI1 es tardía.

Para determinar si la regulación de LOX por parte de EWS/FLI-1 es temprana o tardía, analizamos la expresión de LOX en el sistema celular A673/TR/shEF mediante PCR cuantitativa a las 12, 24 y 48 horas tras la inducción del ARN de interferencia de EWS/FLI1 con doxiciclina. Mientras que la expresión de EWS/FLI1 se reduce aproximadamente un 50% transcurridas 12 horas tras la adición de doxiciclina, la expresión de LOX no aumenta significativamente hasta las 48 horas (Figura 13), luego se trata de una regulación tardía por parte de EWS/FLI1.

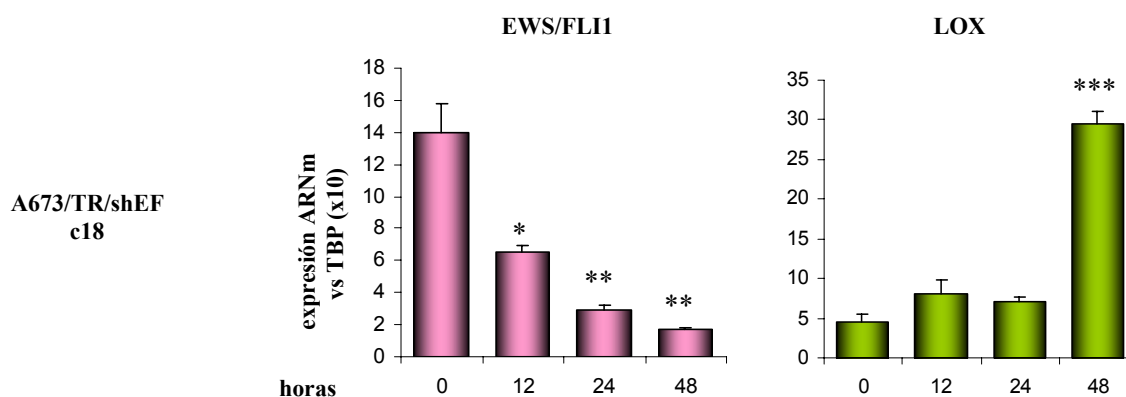


Figura 13. La regulación de la expresión de LOX por parte de EWS/FLI1 es tardía. Se añade doxiciclina a 1 $\mu\text{g/ml}$ al medio de cultivo, y se extrae ARN a las 0, 12, 24 y 48 horas. Se cuantifican los niveles de expresión de EWS/FLI1 y de LOX mediante RT-PCR cuantitativa. Se normalizan los valores frente a TBP. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo por duplicado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ respecto al tiempo 0 horas (one way ANOVA).

4.2.2. Implicación de las vías de señalización autocrinas de IGF-1 y FGF-2 en la regulación de LOX en las células de Ewing.

Debido a que la regulación de LOX por parte de EWS/FLI1 es tardía y por tanto probablemente indirecta, nos planteamos la hipótesis de que algunos factores de crecimiento autocrinos pudieran estar implicados en la regulación de LOX en las células de Ewing, tal y como se ha observado en otras líneas celulares (Palamakumbura et al., 2003; Palamakumbura et al., 2009). Una de las vías más importantes en cuanto a supervivencia celular es la ruta IGF-

1/Akt. Esta ruta de señalización está frecuentemente activada en células tumorales, incluyendo los tumores de la familia Ewing (Kim et al., 2005; Mitsiades et al., 2004). EWS/FLI1 inhibe la expresión del gen *IGF1BP-3* (Proteína de unión a IGF, 3) (Prieur et al., 2004), lo que contribuye a mantener elevados niveles de IGF-1. Teniendo en cuenta que la vía de IGF-1/IGF-1R juega un papel muy importante en los tumores de Ewing (Karnieli et al., 1996; Leavey and Collier, 2008; Scotlandi et al., 2002a; Scotlandi et al., 1998), analizaremos su implicación en la represión de LOX. Así mismo, basándonos en los datos mostrados por el grupo de Palamakumbura en fibroblastos de ratón transformados y en líneas de cáncer de próstata (Palamakumbura et al., 2003; Palamakumbura et al., 2009), analizaremos también la posible implicación de la vía de señalización de FGF-2 en la regulación de LOX.

El abordaje experimental consistió en estudiar el efecto IGF-1 y de FGF-2 sobre la expresión de LOX a nivel a ARN mensajero, previamente inducido con suramin, un componente de naftilurea hexasulfonatada que se ha visto que induce la expresión de LOX en múltiples contextos celulares (Abe et al., 2006; Benini et al., 2001; Lawrence et al., 1997; Minniti et al., 1992; Ravera et al., 1993); Palamakumbura et al., 2003). En primer lugar comprobamos que suramin inducía la expresión de LOX en las células de Ewing. Para ello, se crecieron las células durante 48 horas en presencia de distintas concentraciones de suramin (0, 100 y 150 μ M). Analizamos los niveles de ARN mensajero de LOX mediante RT-PCR cuantitativa y observamos que la expresión de LOX aumenta en las células de Ewing A673, A4573, SKES y TTC466, si bien el efecto en las líneas SKPNDW, SKNMC, RDES y TC71 es menor (Figura 14). A la concentración 150 μ M de suramin se alcanzan mayores niveles de LOX, de modo que ésta es la concentración que se empleó en los estudios posteriores.

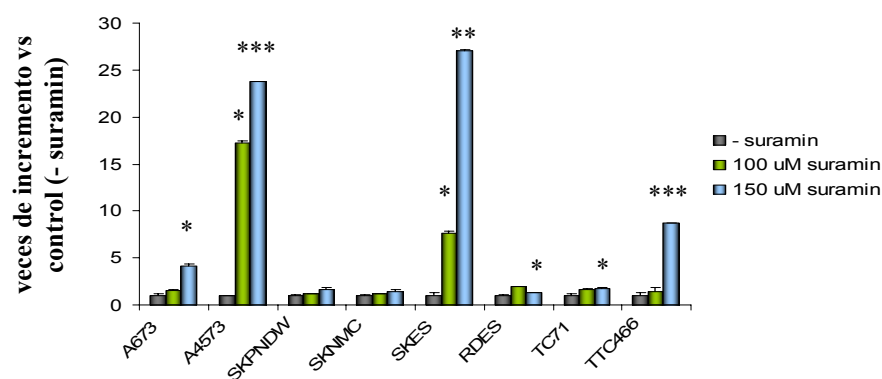


Figura 14. Efecto de distintas concentraciones de suramin sobre la expresión de ARN mensajero de LOX, analizado mediante RT-PCR cuantitativa. Se crecen las células en presencia de 0, 100 y 150 μ M de suramin durante 48 horas, y se analiza la expresión del ARN mensajero de LOX mediante RT-PCR cuantitativa utilizando una sonda Taqman de Applied Biosystems. Los datos se normalizan frente a TBP y frente a los valores en ausencia de suramin. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo por duplicado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,005$ versus control (ausencia suramin) (Prueba T de Student).

A continuación estudiamos si la presencia de IGF-1 en el medio de cultivo revierte el efecto del suramin sobre los niveles de ARN mensajero de LOX, en las células de Ewing en las que el efecto del suramin ha sido mayor (A673, A4573, SKES y TTC466). Paralelamente analizamos el efecto de otro factor de crecimiento, FGF-2. En la figura 15 se observa que el aumento de la expresión de LOX a nivel de ARN mensajero causado por suramin, es revertido en presencia de ambos factores de crecimiento, IGF-1 y FGF-2, en las células de Ewing A673 y SKES y en menor medida en las células A4573. En la línea celular TTC466 sólo hay reversión en presencia de IGF-1.

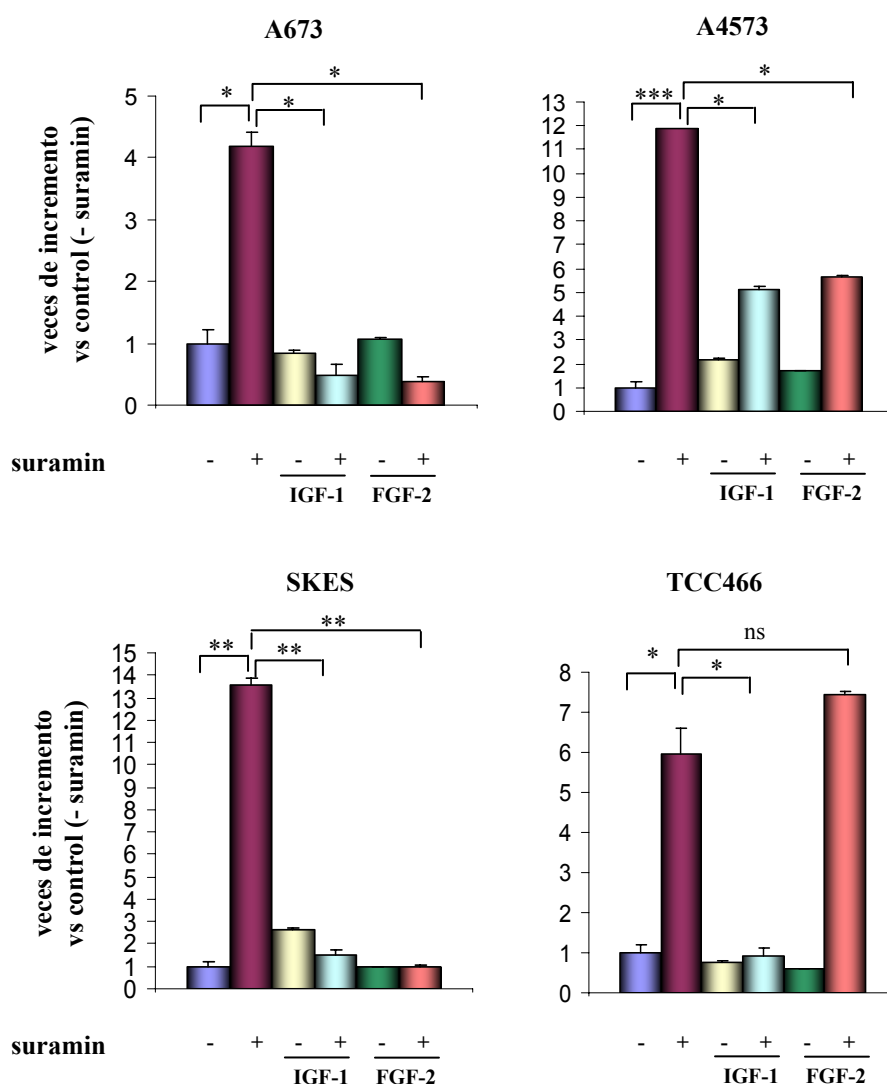


Figura 15. Efecto de suramin, solo y en combinación con los factores de crecimiento IGF-1 y FGF-2, sobre la expresión de LOX a nivel de ARN mensajero en las células de Ewing, analizado mediante RT-PCR cuantitativa. Se crecen las células en presencia de 150 μ M suramin, y de los factores de crecimiento IGF-1 (50 ng/ml) y FGF-2 (40 ng/ml) durante 48 horas, tras lo cual se analiza la expresión del ARN mensajero de LOX utilizando una sonda Taqman de Applied Biosystems. Los datos se normalizan frente a TBP y frente a los valores en ausencia de suramin (control). Media \pm desviación estándar de un experimento representativo por duplicado. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ versus control (ausencia de suramin) (Prueba T de Student). ns, no significativo.

4.3. Papel oncogénico de LOX en los tumores de la familia Ewing.

Hemos descrito anteriormente en la introducción que LOX puede actuar como supresor tumoral en determinados tipos de cáncer, mientras que en los tumores más invasivos, actúa como promotor de metástasis. Nuestros resultados sugieren que en los tumores de Ewing, así como en las líneas tumorales analizadas, LOX podría estar actuando como un gen supresor de tumores, ya que no se expresa o bien se expresa a niveles muy bajos.

4.3.1. Establecimiento de modelos celulares de expresión inducible de LOX, PP-LOX y LOXenz en células de Ewing.

Con el objetivo de estudiar el papel de LOX en los tumores de Ewing, generamos un sistema inducible de expresión de LOX en células de Ewing. Debido a que la función como supresor tumoral reside en la región propéptido de LOX (PP-LOX), mientras que por otro lado la actividad enzimática (LOXenz) está relacionada con la promoción de metástasis, estudiamos el efecto de cada una de las regiones de LOX por separado, así como de la proteína completa (LOX) en las propiedades transformantes de la línea celular de Ewing A673. Para ello, llevamos a cabo el mismo procedimiento experimental utilizado para establecer el modelo celular inducible de ARN de interferencia de EWS/FLI1, pero en esta ocasión empleamos el sistema lentiviral *Virapower Lentiviral Expression Systems*, que nos permite sobreexpresar el ADNc del gen incorporado en el vector lentiviral de manera inducible al añadir doxiciiclina al medio de cultivo.

Para ello, infectamos las líneas celulares de Ewing, A673/TR y SKPNDW/TR, descritas anteriormente, con lentivirus portadores de vectores de expresión con los siguientes ADNc: secuencia de LOX completa (LOX), secuencia de la región propéptido de LOX (PP-LOX) y secuencia de la región enzimática de LOX (LOXenz). En todos los casos, el ADNc correspondiente se clonó en fase de lectura con el epítipo V5, presente en el vector lentiviral pLenti4/TO/V5-DEST, lo que nos facilitará posteriormente la detección de todas las formas de LOX expresadas mediante el anticuerpo anti-V5 correspondiente (Figura 16). Estos modelos celulares nos permitirán hacer estudios comparativos de localización celular y analizar el efecto específico de la expresión de cada una de las regiones de LOX sobre las características tumorales de las células de Ewing. En todos los ensayos, se utilizaron como control las células A673/TR/ y SKPNDW/TR/ infectadas con el vector lentiviral vacío.

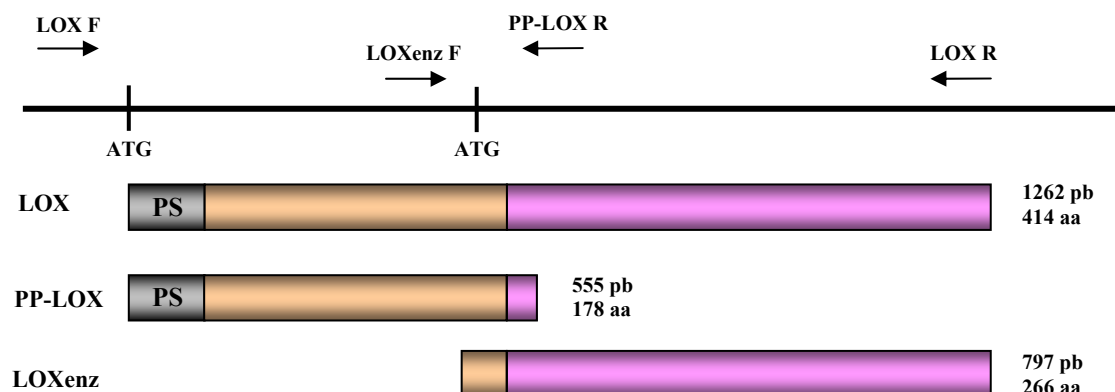
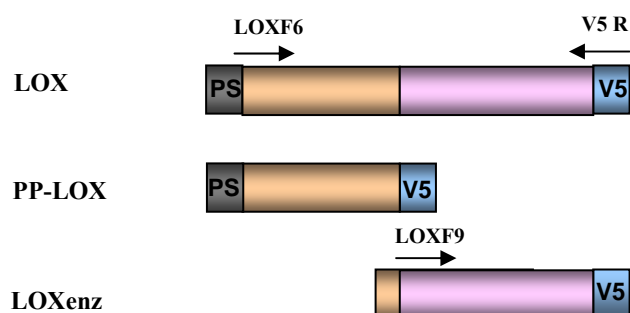


Figura 16. Regiones de LOX clonadas en el vector lentiviral de expresión inducible pLenti4/TO/V5-DEST. Se clonó el ADNc de LOX completo, de la región propéptido PP-LOX y de la enzima madura LOXenz, en el vector lentiviral pLenti4/TO/V5-DEST, lo que nos permitirá estudiar el papel de cada una de las regiones de LOX en el desarrollo de los tumores de Ewing. Se muestran los cebadores utilizados para amplificar cada una de las regiones de LOX (LOX F-LOX R: LOX, LOX F-PPLOX R: PP-LOX, LOXenz F-LOX R: LOXenz), así como el tamaño del fragmento amplificado en pares de bases (pb) y los aminoácidos (aa) que comprenden. PS: péptido señal.

De cada línea celular generada se obtuvieron poblaciones policlonales, que fueron posteriormente utilizadas para la obtención de clones. Aquellos clones con mayor nivel de expresión de LOX completo, de la región propéptido y de la enzima madura se emplearon en los estudios posteriores. La expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz en la línea celular A673/TR/ se confirmó a nivel de ARN mensajero mediante RT-PCR utilizando los cebadores LOXF6 y V5R para detectar la expresión de LOX y de PP-LOX, y los cebadores LOXF9 y V5R para detectar la expresión de LOXenz (Figura 17). Observamos que la expresión de las distintas regiones de LOX no influye en los niveles de expresión de la proteína quimérica EWS/FLI1, de manera que los efectos que observamos en las células de Ewing se deberán a la acción de cada una de las regiones de LOX y no a una disminución de EWS/FLI1.

A



B

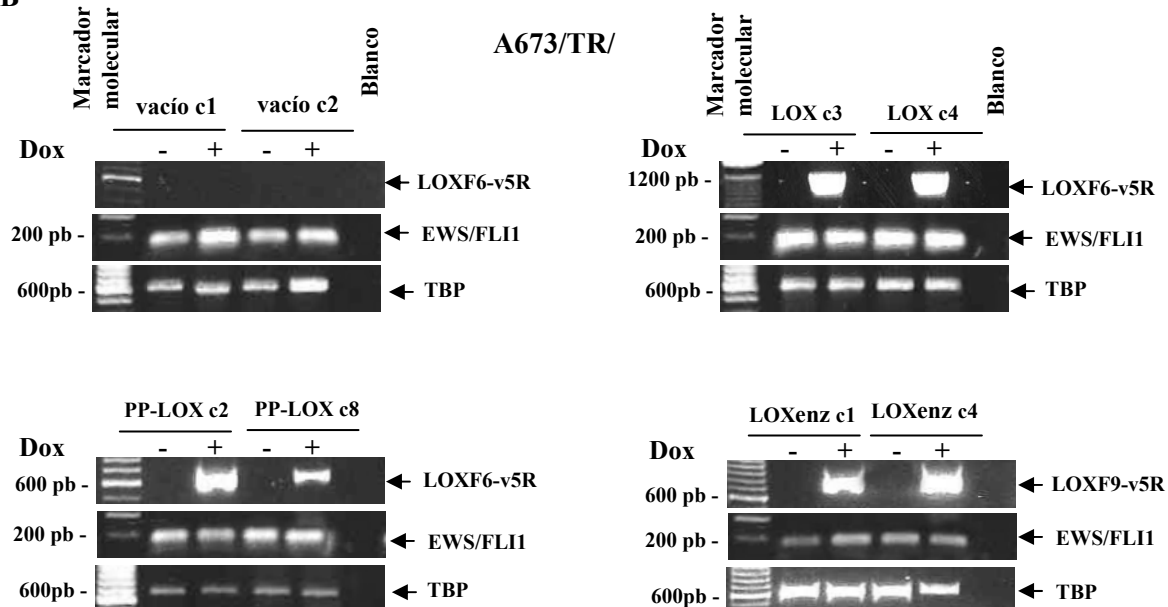


Figura 17. Análisis de la expresión de las distintas regiones de LOX a nivel de ARN mensajero en las células de Ewing A673. A) Esquema que muestra la localización de los cebadores empleados para detectar la expresión de cada una de las regiones de LOX. **B)** Tras 48 horas de añadir doxiciiclina (1 μ g/ml), cuantificamos el nivel de expresión de ARN mensajero de LOX y PP-LOX utilizando los cebadores LOXF6 y V5R, y de LOXenz con los cebadores LOXF9 y V5R, mediante RT-PCR. El cebador V5R detecta el epítipo presente en las regiones de LOX. Se muestra también el nivel de expresión del ARN mensajero de EWS/FLI1 y de TBP.

A continuación, confirmamos la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz a nivel de proteína, con el anticuerpo anti-V5 (Figura 18A y 18B). Los pesos moleculares observados en el Western Blot, corresponden a los pesos moleculares teóricos de LOX, PP-LOX y LOXenz (50, 32 y 18 KDa respectivamente), más el peso molecular del epítipo V5. En cuanto a la región

propéptido (PP-LOX), solo podemos detectar su expresión mediante inmunoprecipitación a partir del medio de cultivo con el anticuerpo V5, seguido de Western Blot (Figura 18C). Se observan dos bandas, que pueden deberse a presencia y ausencia de glicosilación de la región propéptido de LOX. La banda de aproximadamente 60 KDa que observamos corresponde a la cadena pesada de IgG del anticuerpo empleado para inmunoprecipitar.

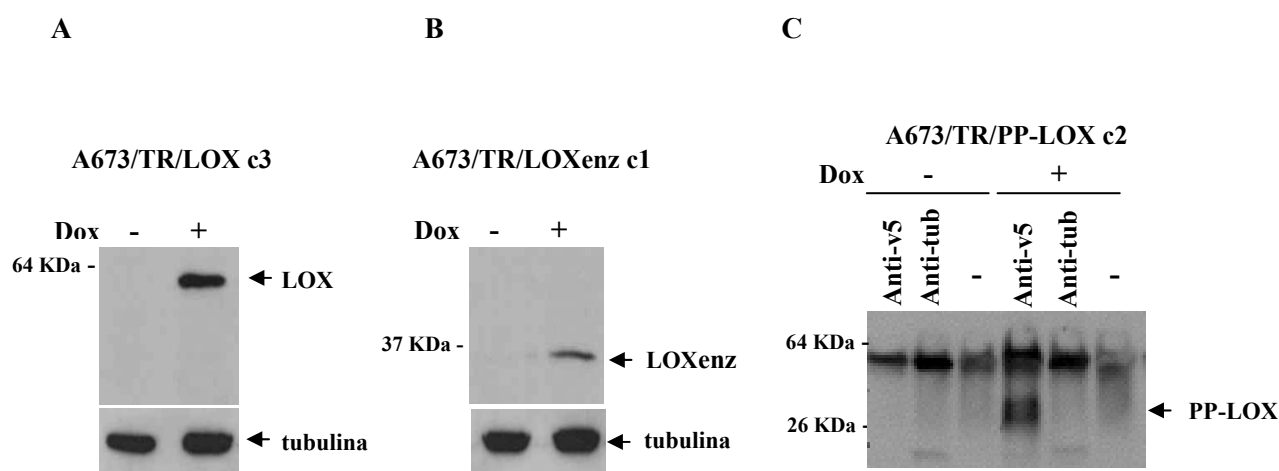


Figura 18. Análisis de la expresión de las distintas regiones de LOX a nivel de proteína en las células de Ewing A673. A) y B) Análisis de los niveles de expresión de LOX y de LOXenz a nivel de proteína, mediante Western Blot, tras 48 horas de inducir su expresión con doxiciplina. Se emplea el anticuerpo anti-V5. La tubulina nos sirve como control de carga. **C)** Inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-V5 a partir del medio de cultivo, para detectar la expresión de PP-LOX, tras 48 horas de añadir doxiciplina. Para comprobar la especificidad del anticuerpo anti-V5, se inmunoprecipita también con un anticuerpo frente a tubulina.

Como se observa en la figura 18, se alcanzan elevados niveles de expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz, de manera que el uso de estos modelos celulares nos permitirá analizar el efecto de la proteína completa de LOX, así como de su región propéptido y de la enzima madura, sobre las características tumorogénicas de la línea celular de Ewing A673.

4.3.2. Localización celular de LOX, LOXenz y PP-LOX.

Para determinar la localización subcelular de LOX, LOXenz y PP-LOX, realizamos ensayos de inmunofluorescencia. En la figura 19 se aprecia como la localización de LOX es fundamentalmente citoplasmática, mientras que LOXenz se localiza en el núcleo. Mediante esta técnica no detectamos PP-LOX, lo que nos indica que tras su secreción no entra de nuevo en la célula o bien que la cantidad que entra es insuficiente para su detección.

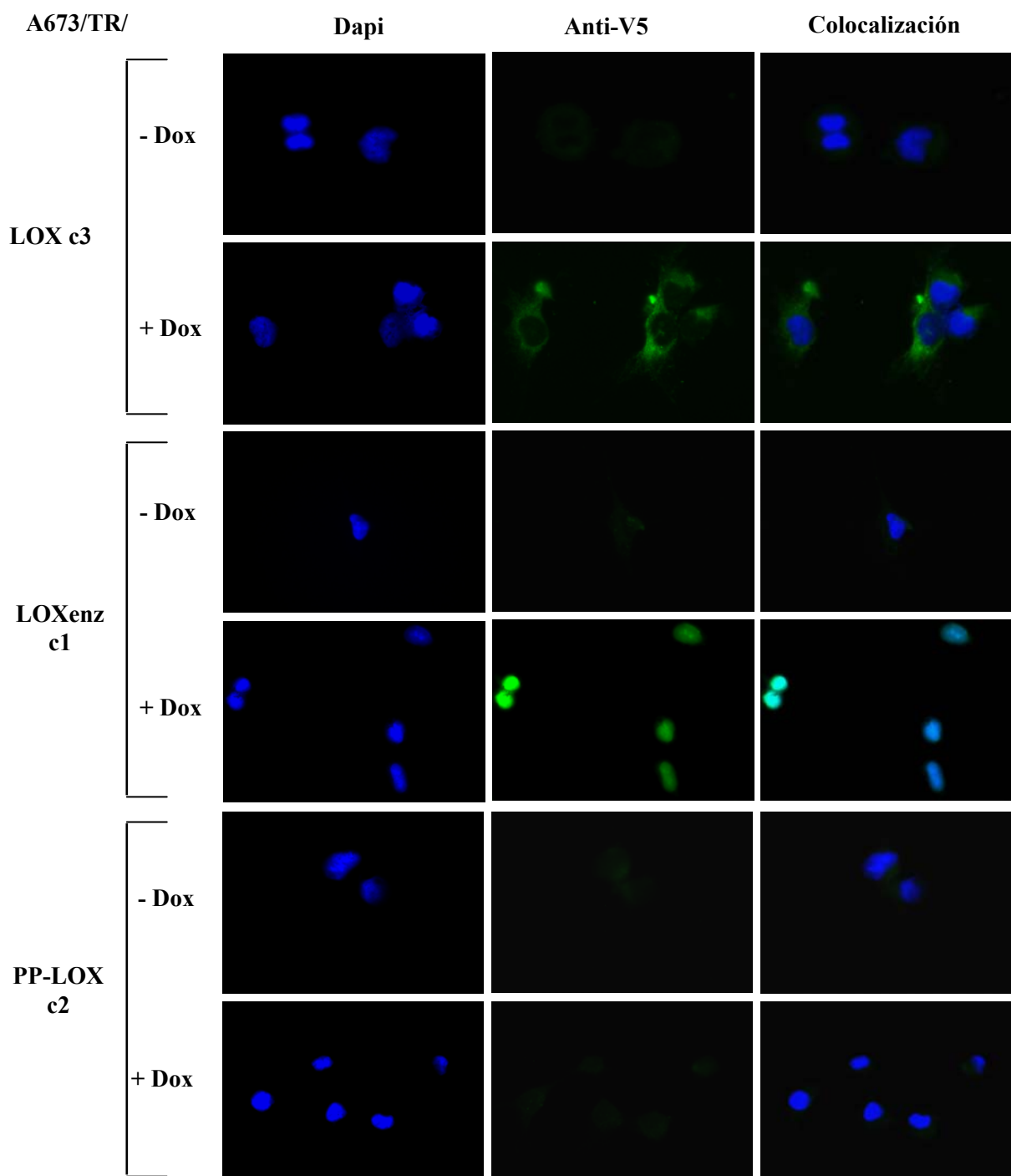


Figura 19. Localización subcelular de las distintas formas de LOX expresadas, analizado mediante inmunofluorescencia. Se cultivan las células como se describe en materiales y métodos, y transcurridas 48 horas tras la adición de doxyciclina, se fijan con metanol absoluto frío. Se emplea el anticuerpo primario anti-V5, que nos permite detectar cada una de las regiones de LOX que llevan acoplado el epítipo V5, y como anticuerpo secundario se emplea anti-mouse FITC. Las fotografías han sido realizadas con aumento 40x.

Confirmamos los resultados de inmunofluorescencia mediante Western Blot, comparando el extracto proteico total frente al nuclear, al mismo tiempo que analizamos la presencia de cada una de las formas de LOX en el espacio extracelular mediante inmunoprecipitación con anti-V5 a partir del medio de cultivo (Figura 20).

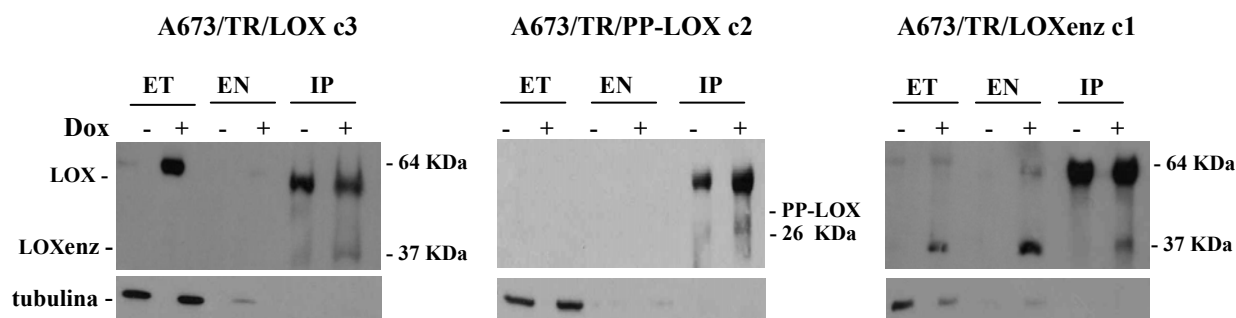


Figura 20. Análisis de la distribución subcelular y extracelular de cada una de las regiones de LOX. Se compara la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz en 20 µg del extracto proteico total (ET) frente a 20 µg del extracto nuclear (EN), tras 48 horas de añadir doxiciclina, y se analiza la presencia de cada región de LOX en el espacio extracelular mediante concentración de 15 ml de medio e inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-V5. La tubulina sólo se expresa en el extracto total, no en el núcleo. En el extracto procedente de la inmunoprecipitación, se observa la cadena pesada de la IgG del anticuerpo empleado para inmunoprecipitar. El gel de A673/TR/PP-LOX es al 12,5 % de acrilamida. El resto de los geles son al 10% de acrilamida.

Estos resultados confirman la presencia de LOX exclusivamente en el citoplasma celular y no en el núcleo, así como su secreción al medio extracelular, donde es procesado dando lugar a LOXenz y a PP-LOX, que no podemos detectar por la pérdida del epítipo V5. No detectamos la presencia de LOXenz procedente de LOX procesado en el extracto total ni en el extracto nuclear, lo que indica que no entra de nuevo en la célula o bien que la cantidad de LOXenz que vuelve al interior celular es demasiado pequeña para que podamos detectarla.

En cuanto a PP-LOX, sólo detectamos su presencia en el medio extracelular, pero no en el interior celular, por tanto PP-LOX no entra en las células de Ewing A673 una vez secretado al medio extracelular, o bien la cantidad de PP-LOX que entra es demasiado pequeña para que podamos detectarla.

En el caso de LOXenz, detectamos una mayor expresión en el extracto nuclear frente al extracto total (que también contiene proteína nuclear), si bien la técnica de Western Blot no es cuantitativa, es decir, que las señales del extracto total y del nuclear no están necesariamente en proporción. La presencia de LOXenz en el núcleo podría deberse a que tras ser expresada en el citoplasma, una parte de la enzima madura se trasloca al núcleo. También detectamos LOXenz

en el medio extracelular, luego la presencia del péptido señal o de la región propéptido de LOX no son necesarias para su normal secreción.

4.3.3. La expresión de LOX y PP-LOX inhibe la proliferación de las células de Ewing A673, mientras que LOXenz la aumenta.

Estudiamos el efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre el crecimiento celular de la línea celular de Ewing A673. Para ello utilizamos tres técnicas diferentes: cuantificación del tiempo de duplicación, análisis del crecimiento celular mediante tinción con cristal violeta y estudio de la viabilidad celular mediante el kit comercial *CellTiter Fluor*. Los resultados obtenidos mediante estas tres técnicas fueron similares.

Como se muestra en la tabla XII, la expresión de LOX aumenta en un 50% el tiempo que tardan las células de Ewing A673/TR en duplicarse, siendo este aumento de un 200% cuando expresamos PP-LOX. Sin embargo, la expresión de LOXenz reduce el tiempo de duplicación, expresado en horas, en un 20 %.

Tabla XII. Tiempo de duplicación, en horas, de las células de Ewing A673/TR, al expresar las distintas regiones de LOX. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,005$ versus las células cultivadas en ausencia de doxyciclina (Prueba T de Student).

Línea celular	Dox	Tiempo medio de duplicación (horas)		% incremento
A673/TR/vacio c1	-	34,67 \pm 0,46		
	+	36,69 \pm 0,79		
A673/TR LOX c3	-	39,01 \pm 8,75		
	+	58,46 \pm 8,55	*	↑ 50 %
A673/TR/PP-LOX c2	-	41,60 \pm 4,83		
	+	138,80 \pm 25,84	**	↑ 200 %
A673/TR/LOXenz c1	-	42,52 \pm 6,10		
	+	34,75 \pm 4,63		↓ 20 %

En la figura 21 se muestra de manera gráfica el efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre el tiempo medio de duplicación en las células de Ewing A673. Como se puede observar, en las células control, infectadas con el vector lentiviral vacío, no hay variación en el número de duplicaciones en ausencia o presencia de doxyciclina. Sin embargo, en las células que expresan LOX, el nº de duplicaciones disminuye un 30% a los 24 días de tratamiento con doxyciclina. El efecto de PP-LOX sobre la proliferación celular es más pronunciado, ya que la disminución es de un 45%. LOXenz tiene un efecto contrario, pues su expresión da lugar a un aumento de un 21% en el nº de duplicaciones de las células de Ewing A673. En la misma figura, se muestran microfotografías tomadas tras 5 días de tratamiento con doxyciclina, en las que se puede observar cómo la expresión de LOX y de PP-LOX van acompañadas de una disminución

en la densidad celular, mientras que la expresión de LOXenz provoca un aumento de la misma. En las células control, la densidad celular permanece invariable.

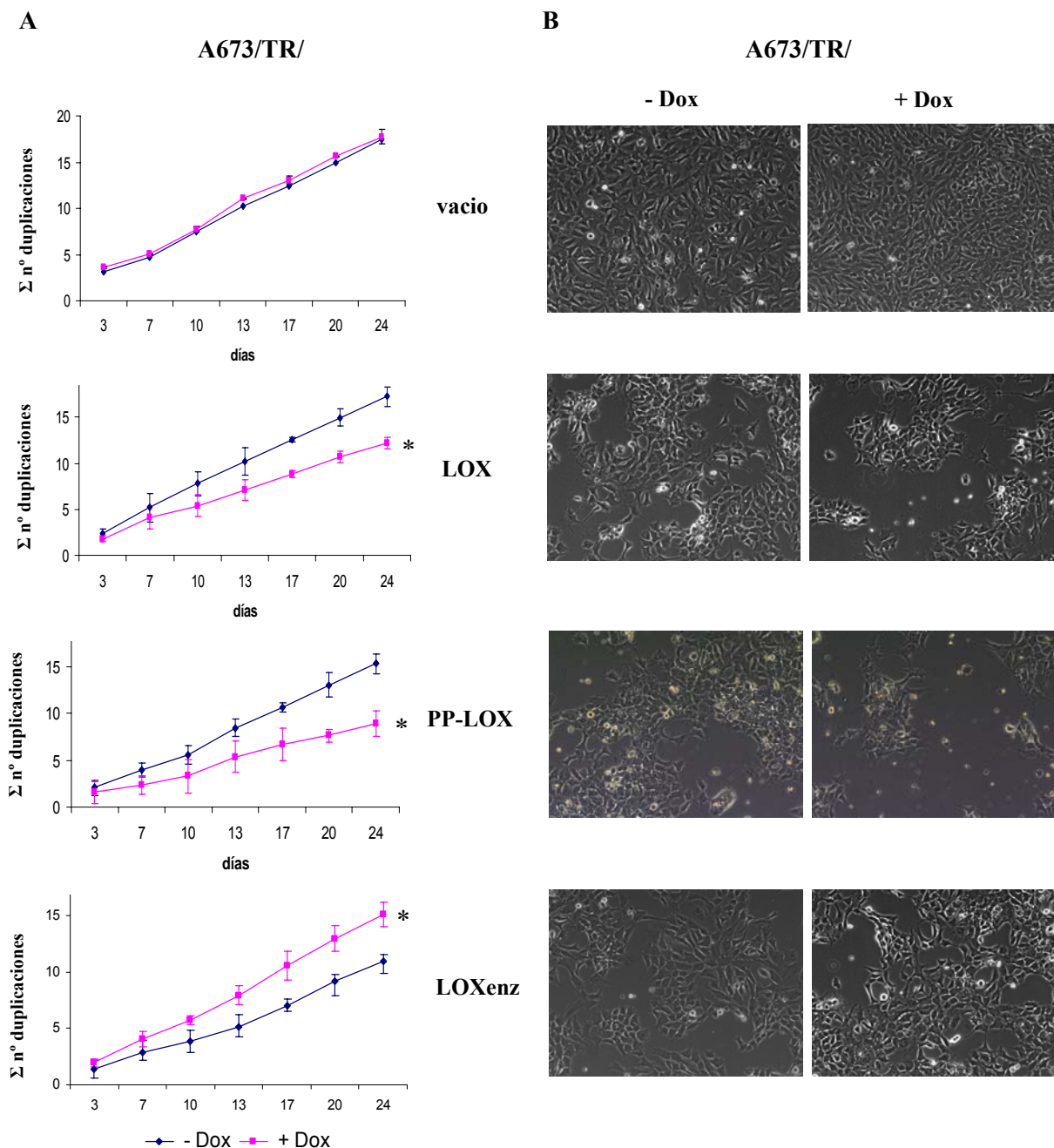


Figura 21. Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz en la tasa de crecimiento de las células A673/TR/. **A)** Sembramos un millón de células y las crecemos en ausencia y presencia de doxyciclina 1 $\mu\text{g/ml}$, durante 3 o 4 días, tras lo cual cuantificamos el número de células. Seguimos el mismo procedimiento durante 26 días y representamos el sumatorio del número de duplicaciones, como se explica en materiales y métodos. Media \pm desviación estándar de tres experimentos. * $P < 0,001$ respecto a las células incubadas en ausencia de doxyciclina (*two way ANOVA*). **B)** Microfotografías de las células A673/TR/, con aumento 10X, expresando las distintas regiones de LOX, tras 5 días de tratamiento con doxyciclina.

Con el objetivo de confirmar estos resultados, analizamos el crecimiento celular mediante tinción con cristal violeta. Mediante esta técnica, obtenemos los mismos resultados, ya que tanto la expresión de LOX como la de PP-LOX disminuyen el crecimiento celular, mientras que la expresión de LOXenz lo aumenta (Figura 22). Sin embargo, observamos que esta técnica es menos sensible, ya que los porcentajes de variación del crecimiento celular son bastante menores que los obtenidos en los estudios anteriores.

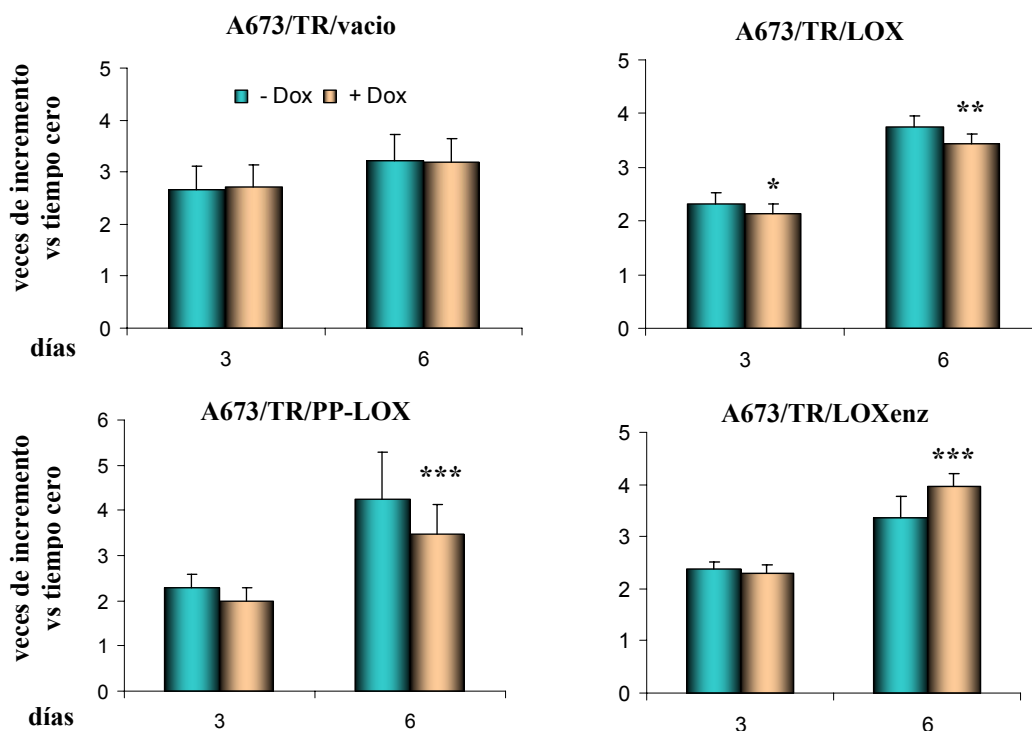


Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre la proliferación de las células de Ewing, analizado mediante tinción con cristal violeta. Las células A673/TR que expresan las distintas regiones de LOX, se incubaron en ausencia o presencia de doxiciiclina (1µg/ml) durante 6 días. El crecimiento celular se cuantificó mediante tinción con cristal violeta a 3 y 6 días. La sobreexpresión de LOX y de PP-LOX produce una reducción del crecimiento celular de un 10 y un 15% respectivamente, mientras que la expresión de LOXenz da lugar a un aumento de un 10%. Las células A673/TR/vacio se utilizan como control. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. Los datos están normalizados frente a los valores en ausencia de doxiciiclina. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ versus las células no estimuladas (Prueba T de Student).

Por último, empleamos una tercera técnica, para confirmar adicionalmente los datos obtenidos con las dos técnicas anteriores. Se trata del ensayo con el reactivo *CellTiter Fluor*, que es un sustrato peptídico fluorogénico, que entra en las células intactas donde es procesado por una actividad proteasa para generar una señal fluorescente proporcional al número de células vivas, pues dicha actividad proteasa se inactiva cuando se pierde la integridad de la membrana celular.

Los experimentos realizados con esta técnica nos permiten confirmar que LOX y PP-LOX disminuyen la proliferación celular mientras que LOXenz aumenta la proliferación (Figura 23). Los resultados de las tres técnicas utilizadas no muestran variación en la proliferación de las células control, A673/TR/vacío.

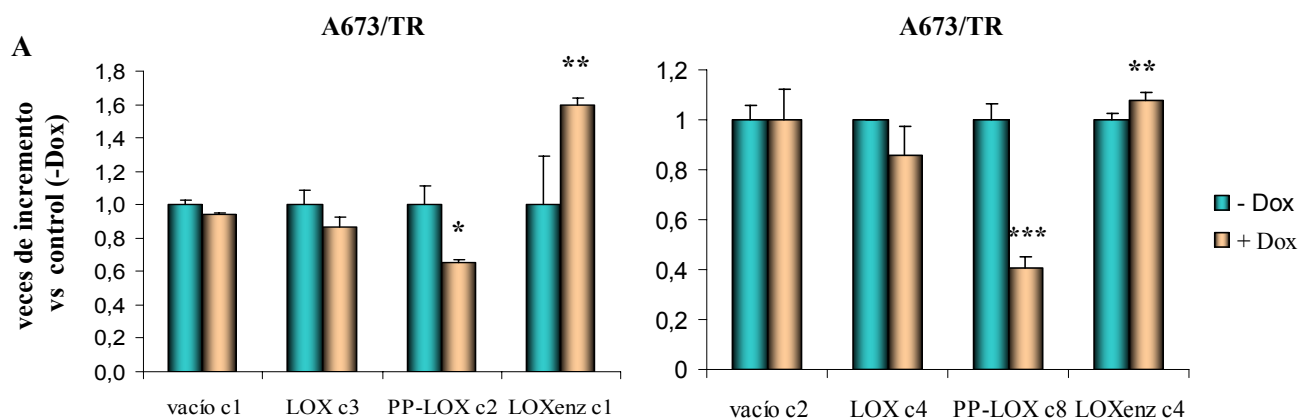


Figura 23. Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre la proliferación de las células de Ewing A673/TR/ analizado mediante el reactivo *CellTiter Fluor*. Las células se crecieron durante 48 horas, y transcurrido ese tiempo, se añadió doxyciclina (1 µg/ml), sustituyendo el medio cada 2 días. Se midió la proliferación celular a los 5 días mediante el ensayo *CellTiter Fluor*. Los datos se normalizan frente a los resultados obtenidos en ausencia de doxyciclina. Media \pm desviación estándar de un experimento representativo por triplicado de dos clones diferentes para cada modelo celular. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$ y *** $P < 0,001$ respecto a las células incubadas en ausencia de doxyciclina (Prueba T de Student).

Estos resultados afianzan la hipótesis de que PP-LOX podría estar actuando como supresor tumoral en los tumores de Ewing, pues su expresión da lugar a una disminución de la proliferación celular.

Para confirmar que el efecto de PP-LOX sobre la proliferación celular es un efecto general en las células de Ewing, desarrollamos una segunda línea de Ewing (SKPNDW) con expresión ectópica e inducible de LOX y PP-LOX (ver materiales y métodos). Como se muestra en la figura 24, la estimulación de las células con doxyciclina durante 48 horas produjo la expresión de niveles elevados de LOX y de PP-LOX. En la figura 24 B se observa que tanto LOX como PP-LOX disminuyen la proliferación de las células SKPNDW, al igual que sucede en la otra línea celular de Ewing analizada, A673. Si bien, en la línea SKPNDW, el efecto de la expresión de LOX y de PP-LOX sobre la proliferación es menor.

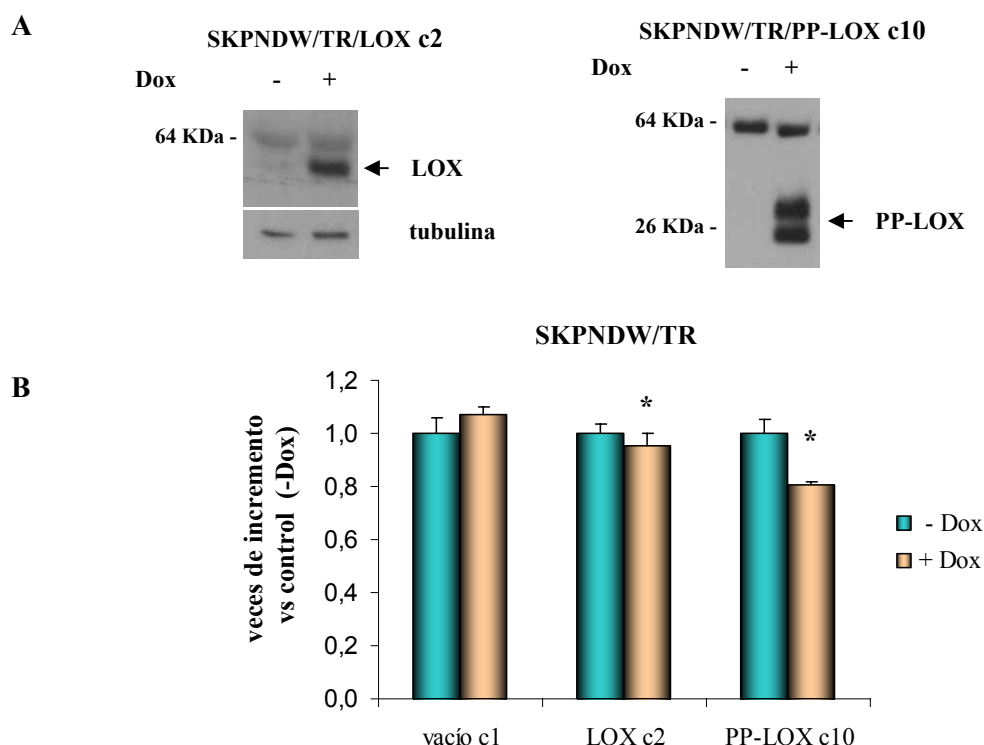


Figura 24. Análisis de la expresión de LOX y PP-LOX en las células de Ewing SKPNDW y efecto sobre la proliferación celular. **A)** Análisis de la expresión de LOX (mediante Western Blot) y de PP-LOX (mediante inmunoprecipitación) a nivel de proteína, en la línea celular de Ewing SKPNDW/TR/. **B)** Efecto de la expresión de LOX y PP-LOX sobre la proliferación celular de la línea de Ewing SKPNDW, analizado con el reactivo *CellTiter Fluor*. Las células se crecieron durante 48 horas, y transcurrido ese tiempo, se añadió doxiciclina (1 µg/ml), sustituyendo el medio cada 2 días. Se midió la proliferación celular a los 5 días. Los datos se normalizan frente a los resultados obtenidos en ausencia de doxiciclina. Media ± desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado. * $P < 0,05$ respecto a las células incubadas en ausencia de doxiciclina (Prueba T de Student).

Además, estos resultados sugieren que el efecto de LOXenz sobre la proliferación celular es dependiente de la actividad enzimática de LOX, y por tanto, la inhibición de esta actividad enzimática debería revertir su efecto. Para estudiar este aspecto, confirmamos en primer lugar la actividad enzimática de LOXenz, mediante un ensayo fluorimétrico. Este ensayo permite detectar el peróxido de hidrógeno liberado en la catálisis de LOXenz gracias al reactivo Amplex Red, que es oxidado dando lugar a un compuesto fluorescente (ver materiales y métodos). En la figura 25 se observa como en presencia de doxiciclina aumenta la actividad de LOXenz.

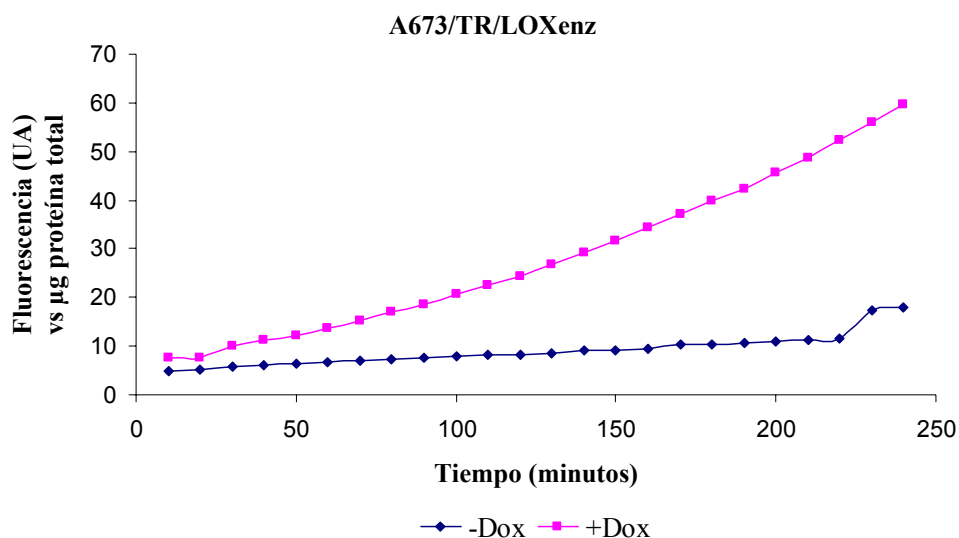


Figura 25. Análisis de la actividad enzimática de LOXenz en la línea celular de Ewing A673/TR/LOXenz c1, mediante el ensayo fluorimétrico con Amplex Red. Se crecen las células en medio sin rojo fenol y se tratan con doxiciclina durante 72 horas para inducir la expresión de LOXenz. Tras el tiempo de incubación, se lisan las células con 10 ciclos de congelación/descongelación y se realiza el ensayo con Amplex Red como se explica en materiales y métodos. Se mide fluorescencia a 544 nm (excitación) y 590 nm (emisión) cada 10 minutos, durante un tiempo total de 4 horas. UA; unidades arbitrarias.

Tras comprobar la existencia de actividad catalítica de LOXenz, empleamos de nuevo el ensayo *CellTiter Fluor* para medir proliferación celular. Observamos que en presencia del inhibidor irreversible de la actividad catalítica de LOX, β APN (beta-aminopropionitrilo), el efecto de LOXenz sobre la proliferación celular es totalmente bloqueado, lo que confirma que dicho efecto es totalmente dependiente de la actividad enzimática de LOX (Figura 26). Además, la incubación de las células A673/TR/LOX con β APN incrementó el porcentaje de inhibición de la proliferación hasta los niveles observados en las células A673/TR/PP-LOX. Este resultado sugiere que la actividad enzimática producida en las células A673/TR/LOX contrarresta el efecto de la región propéptido de LOX sintetizada en estas mismas células. Por último, el inhibidor de la actividad enzimática de LOX, β APN, no tuvo ningún efecto adicional sobre el porcentaje de inhibición observado en las células A673/TR/PP-LOX, indicando, como cabía esperar, que el efecto del propéptido es independiente de la actividad enzimática. En definitiva, los resultados obtenidos muestran que la actividad enzimática de LOXenz es la causa de su efecto sobre la proliferación celular, compitiendo con el efecto de la región propéptido en el caso de la proteína completa.

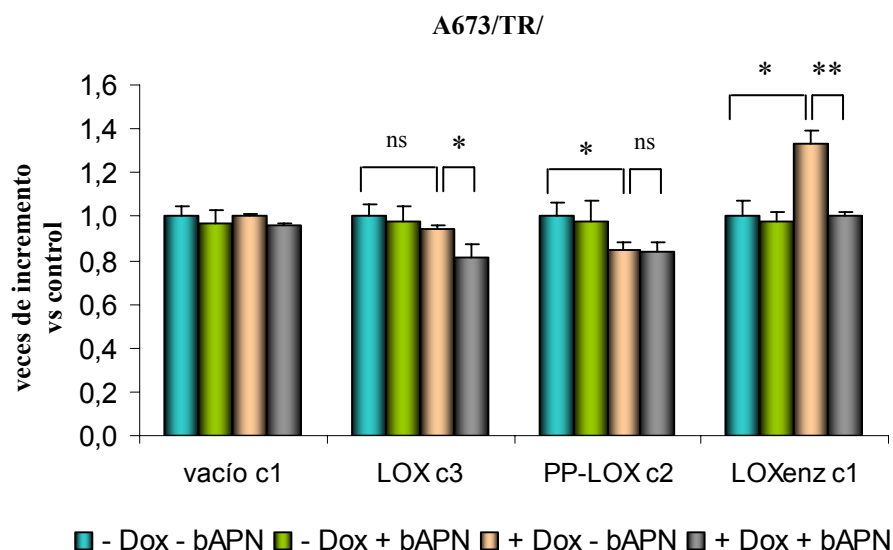


Figura 26. Efecto de las distintas regiones de LOX sobre la proliferación celular de la línea celular de Ewing A673, en presencia del inhibidor de su actividad enzimática, β APN. Se crecieron las células en presencia de doxyciclina (para inducir la expresión de cada una de las regiones de lisil oxidasa) y del inhibidor β APN durante 5 días, tras lo cual se analizó la proliferación celular con el reactivo *CellTiter Fluor*, como se describe en materiales y métodos. Se muestran los datos normalizados frente a los obtenidos en las células cultivadas en ausencia de doxyciclina y de inhibidor (control). Media \pm desviación estándar de 2 experimentos realizados por triplicado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$ (Prueba T de Student). ns, no significativo

4.3.4. Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre el ciclo celular.

A continuación, realizamos estudios de citometría de flujo en la línea celular de Ewing A673, para determinar el efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre el ciclo celular. Como se muestra en la figura 27, la expresión de LOX y de PP-LOX provocó un incremento significativo en el porcentaje de células en la fase G1 del ciclo celular (15 % más de células en esta fase respecto a las células control).

Estos resultados sugieren que la expresión de LOX y de PP-LOX provoca una parada del ciclo celular y confirman los resultados de los experimentos anteriores, en los que se había observado una inhibición de la proliferación celular tras la expresión de LOX y de PP-LOX. Por el contrario, la expresión de LOXenz da lugar a una disminución en el porcentaje de células en fase G1, y a un aumento del 25% de células en fase G2/M.

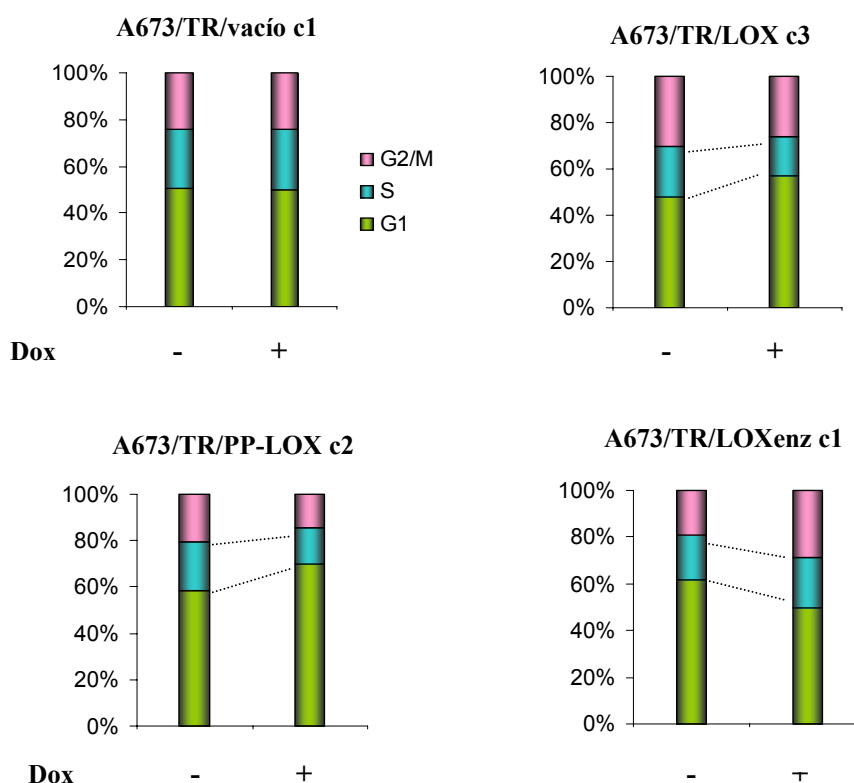


Figura 27. Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre el ciclo celular. Las células A673/TR/ con cada una de las regiones de LOX, se incubaron en ausencia o presencia de doxiciplina (Dox) y se analizaron las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Se muestran los porcentajes de cada una de las fases del ciclo celular. La expresión de LOX y de PP-LOX provoca una acumulación de células en fase G1, mientras que la expresión de LOXenz provoca una acumulación de células en fase G2/M. Media de cuatro experimentos independientes.

4.3.5. La expresión de LOX y PP-LOX disminuye la migración de las células de Ewing A673, mientras que LOXenz la aumenta.

Varios trabajos han demostrado que la expresión de PP-LOX disminuye la migración de células tumorales de mama y de páncreas (Min et al., 2009; Wu et al., 2007; Zhao et al., 2009). Estos resultados nos llevaron a analizar el papel de PP-LOX en la migración dirigida por suero de la línea celular de Ewing A673, para lo que realizamos un ensayo de trans migración a través de membranas de PET (polietileno tereftalato) con poros de 8 μm . Así mismo, analizamos el efecto de la expresión de LOX y de LOXenz en la haptotaxis de las células de Ewing A673. En la figura 28 se observa como la expresión de PP-LOX produce una disminución en la migración celular estimulada por suero de casi un 40%. Al igual que ocurre con la proliferación celular, el efecto de la expresión de LOXenz sobre migración celular es contrario, ya que la aumenta en un 30%.

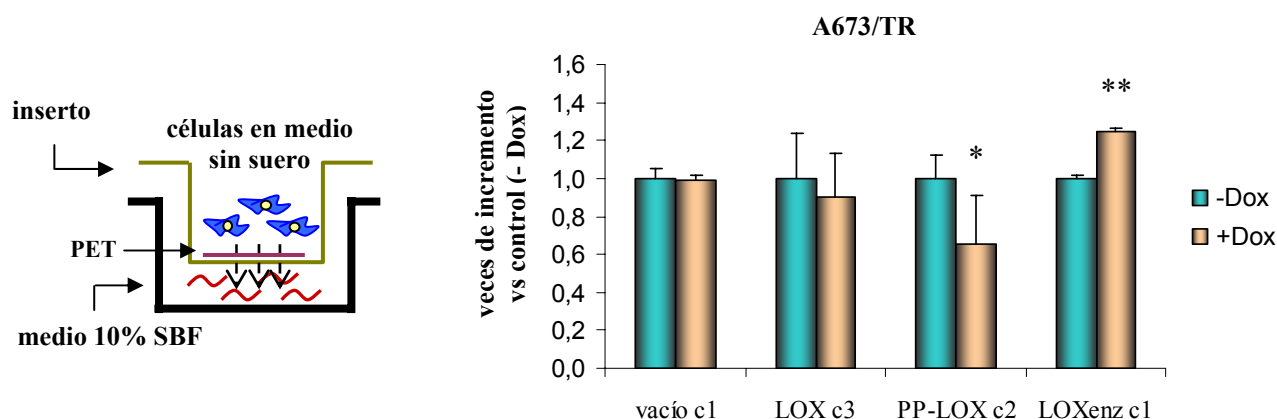


Figura 28. Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre la migración de las células de Ewing A673/TR. Para el ensayo de trans migración (en transwells), se crecieron las células en medio sin suero sobre insertos que tienen una membrana de PET con poros de 8 μm . Las células se incubaron en ausencia o presencia de doxiciplina durante 6 horas, y analizamos mediante fijación y tinción con metanol y cristal violeta, las células que migraron a través de la membrana atraídas por el suero presente en la parte inferior de los pocillos (esquema de la izquierda). Los datos están normalizados frente a los valores en ausencia de doxiciplina. Las células A673/TR/vacío se utilizan como control. SBF; suero bovino fetal. Media \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,0005$ respecto a las células incubadas en ausencia de doxiciplina (Prueba T de Student).

4.3.6. Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz en la formación de focos de crecimiento en agar blando.

A continuación analizamos el efecto de la sobreexpresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre la capacidad de las células de Ewing para formar colonias en medio semisólido, una propiedad característica de las células transformadas.

En la figura 29 se muestran los resultados de estos experimentos. La expresión de LOX en la línea de Ewing A673 provocó una reducción del 26% en el número de colonias creciendo en medio semisólido (27 ± 5 colonias/ cm^2 vs 20 ± 4 colonias/ cm^2). Así mismo, la expresión de PP-LOX dió lugar a una mayor reducción, de un 46% (54 ± 26 colonias/ cm^2 vs 29 ± 5 colonias/ cm^2). La expresión de LOXenz tuvo un efecto contrario, incrementando en un 82% el número de colonias (22 ± 10 colonias/ cm^2 vs 40 ± 7 colonias/ cm^2). A la vista de este resultado, analizamos también el tamaño medio de las colonias. Como se aprecia en la figura 29B, la expresión de PP-LOX produce una disminución del tamaño medio de las colonias del 45% (0.94 ± 0.4 mm^2 vs 0.53 ± 0.1 mm^2), mientras que la expresión de LOXenz tiende a aumentar el tamaño de las mismas (0.53 ± 0.1 mm^2 vs 0.66 ± 0.1 mm^2). Estos resultados sugieren que la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz influye tanto sobre las propiedades transformantes de las células (capacidad para formar colonias en medio semisólido), como sobre su capacidad proliferativa (tamaño de las colonias).

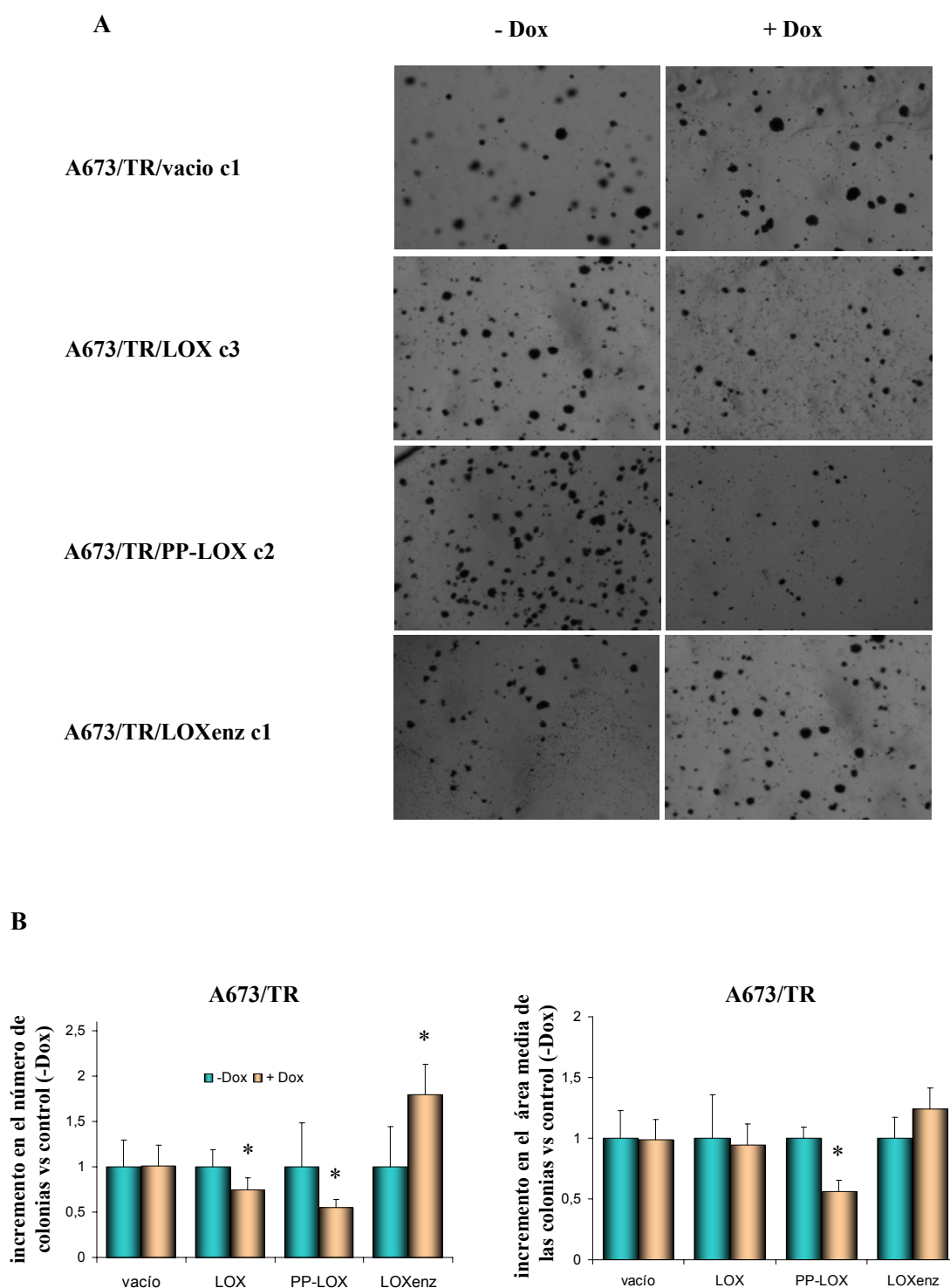


Figura 29. Efecto de la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz sobre la formación de focos de crecimiento en agar blando. A) Las células A673/TR que expresan las distintas regiones de LOX, se sembraron en placas de agar blando y se incubaron en ausencia o presencia de doxyciclina durante 20 días. Al final del periodo de incubación, se tiñeron las colonias con cristal violeta y se fotografiaron con aumento 4X. **B)** El número y área de las colonias se determinó en tres campos al azar con el programa ImageG Media \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ respecto a las células cultivadas en ausencia de doxyciclina (Prueba T de Student).

4.3.7. La expresión de PP-LOX inhibe la formación de tumores *in vivo*.

A continuación, analizamos el efecto de la expresión de PP-LOX sobre la capacidad de las células de Ewing A673 para formar tumores en ratones inmunodeprimidos (*nu/nu*). En estos experimentos, la inducción del ADNc de la región propéptido de LOX se realizó mediante la administración de doxiciclina a los animales en el agua de bebida (1 mg/ml).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 30. La expresión de PP-LOX impidió la formación de tumores. Ninguno de los animales inyectados con las células A673/TR/PP-LOX c2, a los que se administró doxiciclina en el agua de bebida ($n=8$), desarrolló tumores visibles tras 28 días de tratamiento, mientras que cerca del 40% de los animales mantenidos solo con agua desarrollaron tumores en el mismo periodo de tiempo. Se obtuvieron resultados similares con las células A673/TR/PP-LOX c8. Por el contrario, el 50% de los ratones inoculados con las células control A673/TR/vacío c1 desarrollaron tumores, tanto en ausencia como en presencia de doxiciclina en el agua de bebida. A pesar de la baja eficiencia en el desarrollo de tumores, los resultados indican que la expresión de PP-LOX impide la formación de tumores en el 100% de los ratones.

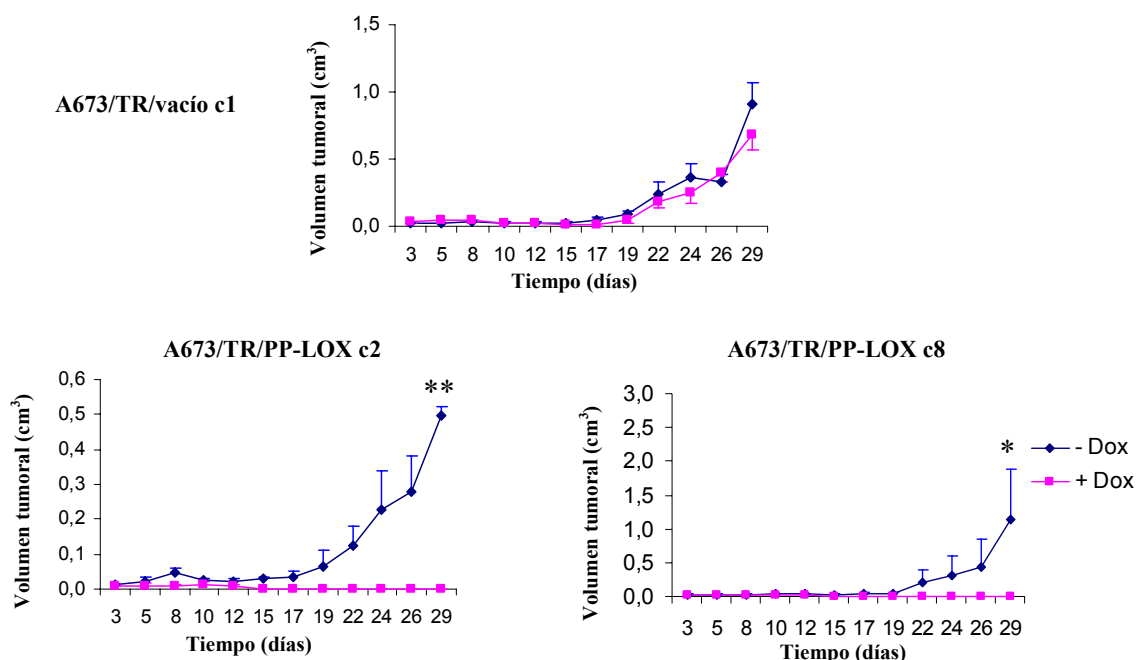


Figura 30. Efecto de la expresión de PP-LOX en la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral en ratones inoculados con las células control A673/TR/vacío (clon 1) y A673/TR/PP-LOX (clones 2 y 8). Tras la inoculación de las células, cada grupo de animales fue dividido en dos subgrupos, uno de los cuales recibió doxiciclina 1 mg/ml en el agua de bebida para inducir la expresión de la región propéptido de LOX. El grupo de ratones inoculados con las células A673/TR/vacío nos sirven como control. Media \pm error estándar de la media. * $P<0,05$, ** $P<0,0001$ (two way ANOVA).

El siguiente abordaje experimental consistió en la inoculación de las células A673/TR/PP-LOX c2 y c8 a los ratones inmunodeprimidos y la adición de doxiciclina al agua de bebida al subgrupo correspondiente una vez alcanzado un tamaño de tumor de 50 mm³. Los resultados de este experimento, mostrados en la figura 31, indican que tras haberse formado el tumor (80 y 50% de los ratones inyectados con los clones c2 y c8, respectivamente), la inducción de PP-LOX ralentiza el crecimiento del mismo (Figura 31).

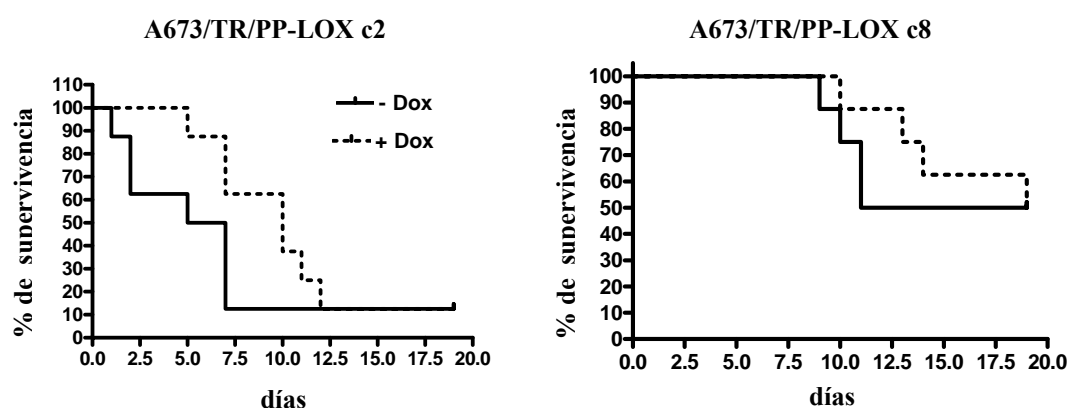


Figura 31. Efecto de la expresión de PP-LOX en el progreso de tumores en ratones inmunodeprimidos. Curvas de supervivencia de los ratones inoculados con las células A673/TR/PP-LOX c2 ($P = 0,19$) y c8 ($P = 0,7$) y tratados con doxiciclina en el agua de bebida una vez que el tumor alcanza un volumen de 50 mm³. Se considera que los ratones fallecen (son sacrificados) cuando el tumor alcanza un volumen máximo de 0,5 cm³. El progreso de los tumores que expresan la región propéptido de LOX (PP-LOX) se compara frente al de los tumores que no lo expresan (sin doxiciclina en el agua de bebida).

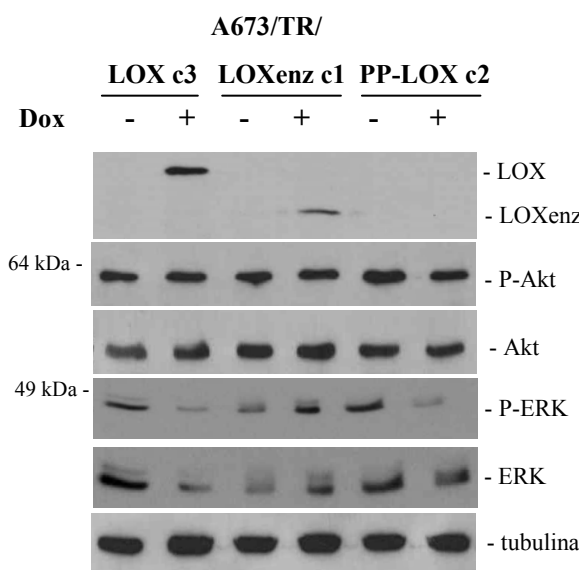
4.4. Mecanismo de acción de LOX

4.4.1. Efecto de la expresión de LOX en las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2 MAPK en las células de Ewing.

Se ha descrito que uno de los mecanismos a través de los cuales la región propéptido de LOX (PP-LOX) ejerce su actividad como supresor de tumores consiste en la inhibición de la vía de señalización de PI3K/Akt así como de ERK/MAPK (Min et al., 2007; Wu et al., 2007), de modo que analizamos el efecto de la expresión de cada una de las regiones de LOX sobre la activación de Akt y de ERK, a nivel de proteína.

Como se observa en la figura 32, la expresión de LOX reduce la activación de ERK en un 90% y PP-LOX en un 85%, mientras que LOXenz produce un aumento de un 45% en la fosforilación de dicha MAP quinasa. Por otro lado, ninguna de las regiones de LOX produce cambios significativos en la activación de Akt. Basándonos en estos resultados, analizamos el efecto de la expresión de LOX y PP-LOX a distintos tiempos (6, 12, 24 y 48 horas) sobre la activación de ERK, para determinar si la regulación de esta vía de señalización por parte de PP-LOX se trata de una regulación temprana o tardía (Figura 33).

A



B

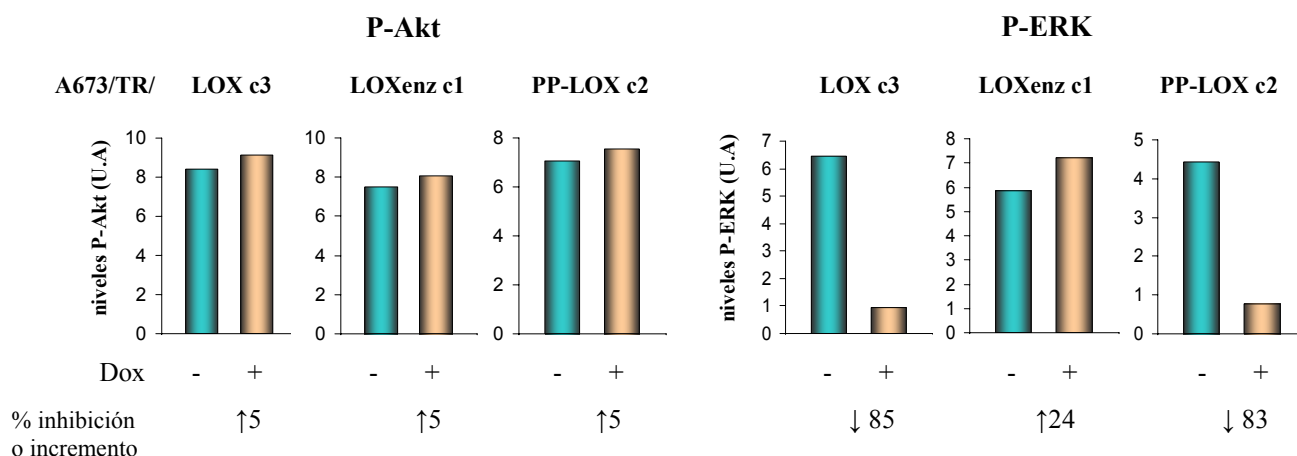


Figura 32. Efecto de la expresión de las distintas regiones de LOX sobre la activación de Akt y de ERK. A) Tras 48 horas de añadir doxyciclina para inducir la expresión de LOX, PP-LOX y LOXenz, se extrajo la proteína total y se analizó la expresión de cada una de las regiones de LOX con el anticuerpo anti-V5, así como de los niveles totales de Akt y ERK y de sus formas activas fosforiladas (P-Akt y P-ERK). La tubulina se emplea como control de carga. **B)** Se muestran las gráficas cuantitativas del análisis densitométrico así como los porcentajes de inhibición (↓) o de incremento (↑) de P-Akt y de P-ERK. Los valores de P-Akt y P-ERK se normalizaron frente a los niveles de Akt y ERK totales, normalizados a su vez frente a los valores de tubulina. U.A: unidades arbitrarias.

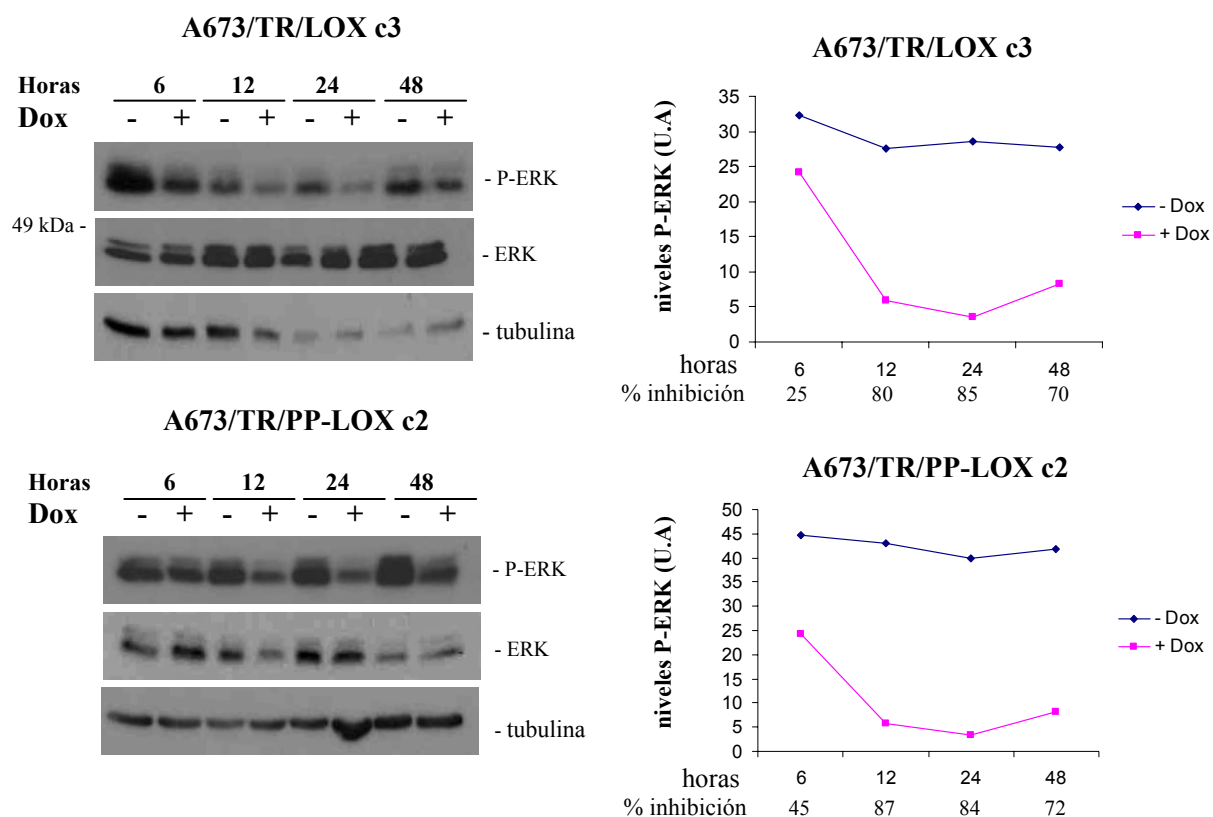


Figura 33. Efecto de la expresión de LOX y de PP-LOX sobre la activación de ERK a distintos tiempos. Se extrajo proteína total a las 6, 12, 24 y 48 horas tras añadir doxiciclina, y se analizó la expresión de ERK activado (P-ERK). La tubulina se emplea como control de carga. Se muestran las gráficas cuantitativas del análisis densitométrico, así como los porcentajes de inhibición de la expresión de P-ERK. Los valores de P-Akt y P-ERK se normalizaron frente a los niveles de Akt y ERK totales, normalizados a su vez frente a los valores de tubulina. U.A: unidades arbitrarias.

A las seis horas ya se observa una disminución del 45% en la activación de ERK en presencia de PP-LOX y a las doce horas tras la expresión de LOX y de PP-LOX se observa una disminución de un 80 y un 87% respectivamente en la activación de ERK, lo que indica que tanto LOX como PP-LOX regulan dicha vía de señalización de forma temprana.

5. Discusión

Como ya hemos comentado previamente en la introducción, el factor de transcripción quimérico EWS/FLI1 desempeña un papel central en el desarrollo de los tumores de Ewing, a través de la regulación aberrante de diversos genes implicados en oncogénesis (Arvand et al., 2001; Janknecht, 2005; Kovar, 1998; May et al., 1993b; West, 2000). Es por ello que la identificación y caracterización funcional de los genes regulados por estas proteínas de fusión nos ayudaría a entender los mecanismos tumorigénicos implicados en los sarcomas de Ewing y a encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan mejorar el tratamiento de los mismos y a aumentar por tanto la actualmente estancada tasa de supervivencia.

En los últimos años, el empleo de múltiples modelos celulares y técnicas moleculares han permitido el descubrimiento de algunos de los posibles genes diana de las mencionadas proteínas de fusión (Baer et al., 2004; Braun et al., 1995; Carrillo et al., 2007; Deneen et al., 2003; Gangwal et al., 2008; Garcia-Aragoncillo et al., 2008; Lessnick et al., 2002; Mackintosh et al., 2010; Mendiola et al., 2006; Ohali et al., 2004; Prieur et al., 2004; Rorie et al., 2004; Siligan et al., 2005; Staeger et al., 2004; Tirado et al., 2006; Wai et al., 2002; Welford et al., 2001). Debido a que EWS/FLI1 está presente en el 90 % de los casos de los tumores de Ewing, decidimos estudiar los genes regulados por este factor de transcripción quimérico. La estrategia seguida para identificar posibles genes regulados por EWS/FLI1 en células de Ewing consiste en el uso de un modelo de ARN de interferencia frente a EWS/FLI1 en la línea celular de Ewing A673, y el posterior análisis mediante micromatrices de oligonucleótidos del perfil de expresión génica en presencia o ausencia de la proteína de fusión. Esta técnica nos ha permitido identificar varios genes regulados por EWS/FLI1 pero no por FLI1. Entre los genes inducidos por EWS/FLI1 destacan CCK y NR0B1, y diversos trabajos publicados por nuestro grupo corroboran su regulación por parte de EWS/FLI1, así como su implicación en el desarrollo de estos tumores (Carrillo et al., 2007; Garcia-Aragoncillo et al., 2008; Mendiola et al., 2006). En cuanto a los genes reprimidos por la proteína de fusión, nos hemos centrado en el gen que codifica para la enzima extracelular Lisil Oxidasa (LOX), ya que presentaba en estos ensayos un elevado nivel de regulación. De este modo, tanto el papel funcional de LOX en los tumores de Ewing como el mecanismo de regulación de su expresión por parte de EWS/FLI1, han sido el objeto de estudio desarrollado en esta tesis.

La expresión de LOX es reprimida por EWS/FLI1 en células de Ewing.

El uso de un modelo inducible de ARN de interferencia específico para EWS/FLI1 en la línea celular de Ewing A673, nos ha permitido demostrar que el silenciamiento de la proteína de fusión aumenta significativamente el nivel de expresión de LOX, y que por tanto EWS/FLI1

reprime su expresión en las células A673. Sin embargo, como hemos observado en el apartado de resultados, EWS/FLI1 disminuye el nivel de ARN mensajero de LOX de forma tardía. Este resultado, junto con el hecho de que el promotor de LOX no presenta sitios potenciales de unión ETS, ni microsatélites con varias repeticiones (al menos 4) de la secuencia GGAA, a los que se ha visto que se une EWS/FLI1 (García-Aragoncillo et al., 2008), sugieren que la regulación de LOX por parte de EWS/FLI1 puede ser indirecta. De hecho, otros grupos han comprobado mediante análisis *in silico* (Kauer et al., 2009) y en estudios de Inmunoprecipitación de Cromatina-Secuenciación (ChIp-Seq) (Guillon et al., 2009) que los genes reprimidos por EWS/FLI1 no muestran ningún enriquecimiento de sitios de unión ETS para la proteína de fusión. Por el contrario, sí se identificaron sitios de unión para otros factores de transcripción en las regiones reguladoras de estos genes (Kauer et al., 2009). Estos resultados sugieren que el mecanismo de represión génica mediado por EWS/FLI1 puede ser indirecto.

Uno de los factores de transcripción que pudiera estar implicado en el mecanismo de represión génica de LOX mediado por EWS/FLI1 es *NKX2.2*, un represor transcripcional fuertemente inducido por la proteína de fusión (Smith et al., 2006). *NKX2.2* codifica para un factor de transcripción homeobox, implicado en la regulación del desarrollo (Owen et al., 2008), que actúa como represor transcripcional reclutando correpresores de la familia Groucho. Además, se ha visto que en las líneas celulares de Ewing cerca de la mitad de los genes reprimidos por *NKX2.2* coinciden con los genes reprimidos por EWS/FLI1 (Owen et al., 2008), y entre estos se encuentra LOX. Estos resultados nos llevan a analizar la existencia de regiones potenciales de unión de *NKX2.2* en el promotor de LOX mediante un análisis *in silico*, encontrando tres sitios putativos de unión de *NKX2.2* alrededor de la posición – 600 en relación al inicio de transcripción. Estudios de represión del promotor de LOX en presencia de *NKX2.2* permitirían confirmar la implicación de este factor de transcripción en el mecanismo de regulación de LOX por parte de EWS/FLI1.

Otro modo de represión mediado por EWS/FLI1 puede implicar mecanismos epigenéticos, ya que entre los genes diana activados por EWS/FLI1 se encuentran bastantes genes que codifican para enzimas modificadoras de histonas. Una de estas enzimas es EZH2 (Richter et al., 2009), que forma parte del complejo PRC2 y metila la lisina 27 de la histona H3, mediando así el silenciamiento génico (Burdach et al., 2009). Este mecanismo de represión por parte de EWS/FLI1 también podría explicar por qué LOX no se expresa en las células y tumores de Ewing o lo hace a niveles muy bajos. De hecho, otros grupos ya habían observado que LOX está inactivado por metilación bialélica del ADN o pérdida de heterozigosidad con metilación del promotor en líneas celulares de cáncer gástrico, de pulmón, de colon y de ovario (Kaneda et al., 2004). Además, LOX se localiza en el cromosoma 5q (Hamalainen et al., 1993), locus

afectado frecuentemente por el fenómeno de pérdida de heterozigosidad en cáncer gástrico (Sano et al., 1991; Tamura et al., 1995), y aunque se considera que los genes diana de este fenómeno en el locus 5q son APC (5q21-22) o IRF-1 (5q31.1) (Cho and Vogelstein, 1992; Willman et al., 1993), LOX (5q23.2) podría ser un gen diana adicional, ya que su localización cromosómica se sitúa entre APC e IRF-1.

Un mecanismo alternativo de regulación de LOX por parte de EWS/FLI1 podría implicar las vías de señalización autocrinas de IGF-1 y de FGF-2. La ruta de señalización de IGF-1/IGF-1R está frecuentemente activada en células tumorales, incluyendo los tumores de la familia Ewing (Kim et al., 2005; Luo et al., 2003; Mitsiades et al., 2004). EWS/FLI1 inhibe la expresión del gen *IGFFBP-3* (Proteína de unión a IGF, 3) (Prieur et al., 2004), lo que contribuye a mantener elevados niveles de IGF-1. Por otro lado, el grupo de Palamakumbura ha demostrado que elevados niveles de FGF-2 disminuyen la expresión de LOX en fibroblastos transformados de ratón y en líneas celulares de cáncer de próstata (Palamakumbura et al., 2003; Palamakumbura et al., 2009). Está bien establecido que las células tumorales de Ewing expresan FGF-2 y sus receptores (Hotfilder et al., 2005), lo que podría explicar la baja expresión de LOX en las mismas. Para estudiar la implicación de la vía de IGF-1 y de FGF-2 en la regulación de LOX en las células de Ewing, empleamos el reactivo suramin (un componente de naftilurea hexasulfonatada), ya que se ha visto que induce la expresión del ARN mensajero de LOX a través de la inhibición de las vías de señalización autocrinas, por interacción directa con los factores de crecimiento (Abe et al., 2006; Benini et al., 2001; Lawrence et al., 1997; Minniti et al., 1992; Ravera et al., 1993; Palamakumbura et al., 2003; Zhang et al., 2001). Hemos visto que en algunas células de Ewing, el suramin aumenta la expresión de LOX, y que este aumento es revertido en presencia de IGF-1 y de FGF-2 en las líneas de Ewing A673, A4573 y SKES y sólo en presencia de IGF-1 en la línea celular TTC466. Estos resultados sugieren que las vías de señalización autocrinas mediadas por factores de crecimiento, entre las que se encuentran las vías de IGF-1 y FGF-2, inhiben la expresión de LOX, pudiendo ser responsables de su baja expresión en las células y tumores de Ewing.

El conocimiento de la vía a través de la cual EWS/FLI1 reprime la expresión de LOX, podría tener gran importancia a la hora de buscar estrategias para evitar dicha represión, permitiendo así la expresión de LOX y en consecuencia su actividad oncosupresora en los tumores de Ewing.

Papel oncogénico de LOX en los tumores de Ewing.

Desde el descubrimiento de LOX, la mayoría de los estudios se centraron en su actividad catalítica sobre las fibras de colágeno y elastina, esencial para la biogénesis, estabilidad y normal funcionamiento del tejido conectivo (Pinnell and Martin, 1968). Sin embargo, estudios mas recientes atribuyen múltiples funciones biológicas a LOX entre las que se encuentran diferenciación celular, migración, transformación, supresión tumoral, regulación génica y regulación del desarrollo (Hornstra et al., 2003; Kagan and Li, 2003; Maki et al., 2005; Vora et al., 2010a).

Hemos visto que una función adicional de LOX es la de supresor tumoral, función que fue sugerida tras el hallazgo de que la expresión de LOX está disminuida en células transformadas con el proto-oncogen *ras*, así como en diversas líneas celulares tumorales (Contente et al., 1990; Palamakumbura et al., 2004) y en algunos tipos de cáncer humano, como carcinoma de próstata, de piel, de estómago, de esófago y de bronquios entre otros (Hamalainen et al., 1995; Kuivaniemi et al., 1986; Payne et al., 2007; Ren et al., 1998). La función de LOX como supresor tumoral quedó demostrada al comprobar que una disminución en sus niveles de expresión en fibroblastos normales de rata les confiere propiedades tumorogénicas, además del hecho de que LOX es capaz de suprimir el potencial oncogénico de *ras* en fibroblastos transformados de ratón (Giampuzzi et al., 2001; Ren et al., 1998). La acción oncosupresora de LOX es incrementada por el inhibidor de su actividad enzimática, β -aminopropionitrilo, lo que pone de manifiesto que es la región propéptido de LOX la que ejerce como supresor tumoral (Min et al., 2007; Palamakumbura et al., 2009; Wu et al., 2007), y que LOXenz contrarresta el efecto de PP-LOX en la proteína completa de LOX, tal y como hemos podido comprobar en esta tesis (Figura 26)

Paradójicamente, en los últimos años han aparecido varios estudios apoyando un posible papel de LOX y LOXL2 como promotores tumorales y potenciadores de la invasión tumoral (Erler et al., 2006; Kirschmann et al., 2002; Payne et al., 2007). Kirschmann y colaboradores han observado que LOX está aumentado en células de cáncer de mama invasivo comparado con las células poco invasivas, y que la actividad catalítica de LOX aumenta el potencial invasivo de las líneas celulares de cáncer de mama no metastático. También se ha observado que la expresión de LOX aumenta en condiciones de hipoxia, lo que da lugar a una mayor polimerización de actina, y por tanto a un aumento de la adhesión celular y migración promovida por la actividad de FAK (Focal Adhesion Kinase) (Erler et al., 2006; Manalo et al., 2005), efecto contrario al observado en presencia de PP-LOX, que inhibe dicha vía de señalización. El inhibidor irreversible específico para la actividad enzimática de LOX, β -

aminopropionitrilo, reduce significativamente la metástasis del cáncer de mama en ratón, lo que sugiere que LOX enzima, y no PP-LOX, es responsable del aumento de la metástasis (Erler and Giaccia, 2006; Kirschmann et al., 2002; Palamakumbura et al., 2009; Payne et al., 2005).

Por lo tanto, se pone de manifiesto una dualidad de LOX en su papel en cáncer. Dicha dicotomía puede depender del tipo celular y tejido, de la etapa de diferenciación en la que se encuentre la célula, de diferencias genéticas con respecto a la disponibilidad de sustratos de LOX, de un desequilibrio entre la expresión/actividad del propéptido de LOX (PP-LOX) y la enzima madura de LOX (LOXenz), de interacciones entre las células tumorales y las del estroma, de la rigidez de la matriz extracelular, así como de actividades biológicas pleomórficas de LOX (Payne et al., 2007).

Sin embargo, en lo que concierne a los tumores de Ewing, LOX se presenta como un posible supresor tumoral, ya que su expresión en los tumores y en las células de Ewing está disminuida, como se ha observado en otras líneas celulares (Payne et al., 2007). Para profundizar en el papel de LOX en los tumores de Ewing, empleamos un modelo celular inducible de expresión del ADNc de la enzima lisil oxidasa completa (LOX), de la región propéptido (PP-LOX) y de la enzima madura (LOXenz), establecidos en líneas celulares de Ewing. Este modelo nos permitirá estudiar el papel funcional de cada una de las regiones de LOX en los tumores de Ewing. El sistema elegido presenta varias ventajas en comparación con los sistemas convencionales de transfección transitoria de ADNc, entre las que cabe destacar una mayor reproducibilidad así como la posibilidad de realizar estudios a largo plazo y sobre proteínas cuya expresión resulte tóxica para la célula, lo cual no puede ser llevado a cabo con los sistemas de expresión constitutiva de ADNc.

A pesar de que en el desarrollo de esta tesis hemos estudiado también el posible papel de LOX como inductor de la migración (paso previo a la metástasis) ejercido por la enzima madura (LOXenz) en los tumores de Ewing, los resultados obtenidos en la misma apoyan la hipótesis de que en este tipo de tumores, LOX actúa como supresor tumoral, ya que hemos visto que su expresión es reprimida por EWS/FLI1 en las líneas de Ewing, y que la expresión ectópica de LOX, y más concretamente la de su región propéptido PP-LOX, disminuyen las propiedades tumorogénicas de las células de Ewing. Además hemos observado que la expresión de LOX y de PP-LOX no influye en los niveles de expresión de la proteína quimérica EWS/FLI1, de manera que los efectos observados en las células de Ewing se deben a la acción de la región propéptido de LOX (PP-LOX), y no a una disminución de EWS/FLI1.

Tras caracterizar los modelos celulares generados, analizando la expresión y localización celular de cada una de las regiones de LOX, hemos observado que LOX es secretado al medio extracelular, donde es procesado dando lugar a LOXenz y a PP-LOX, aunque no podemos detectar la presencia de la región propéptido con el anticuerpo anti-V5 debido a la pérdida del epítipo. En el interior celular, LOX se localiza en el citoplasma pero no en el núcleo, como se había visto anteriormente en el caso de LOX murino (Seve et al., 2002). Por el contrario, en el interior de la célula LOXenz presenta localización nuclear. Nuestros resultados sugieren que la presencia de LOXenz en el núcleo podría deberse a que tras ser expresada en el citoplasma, una parte de la enzima madura se trasloca al núcleo mientras que otra parte se secreta al medio extracelular, donde también detectamos su presencia. También podría tratarse de LOXenz secretada, ya que hay estudios que muestran que la enzima madura puede entrar de nuevo en las células y concentrarse en el núcleo (Hayashi et al., 2004; Li et al., 1997; Nellaiappan et al., 2000), donde es capaz de inducir cambios en la cromatina, por desaminación de componentes de la misma como la histona H1 (Giampuzzi et al., 2003b; Kagan et al., 1983). Esto demuestra que LOXenz ejerce su acción regulando la expresión génica, como se ha descrito en el caso de los genes de colágeno III y elastina (Giampuzzi et al., 2000; Lucero and Kagan, 2006; Rodriguez et al., 2008a). En la literatura hay resultados controvertidos en relación a si la región propéptido es esencial para la secreción de la enzima madura. Nuestros resultados concuerdan con lo observado por Kagan, que demostró que dicha región propéptido no es esencial (Kagan et al., 1995), si bien Min y colaboradores han indicado que la eliminación completa del dominio PP-LOX en las construcciones de expresión resulta en una pérdida de secreción extracelular de LOXenz (Min et al., 2007). En un trabajo más reciente se sugiere que los residuos 112-136 del extremo C-terminal pueden ser importantes en la secreción de LOX (Vora et al., 2010b)(Vora et al. 2010), ya que contienen los sitios de N y O-glicosilación de PP-LOX, que suelen actuar como señales para clasificar a las proteínas en sus compartimentos subcelulares correctos (Scheiffele et al., 1995). En cuanto a PP-LOX, solo hemos podido detectarlo en el medio extracelular, donde podría ejercer su acción mediante señalización a través de receptores de membrana. Sin embargo, el grupo de Guo ha observado que PP-LOX recombinante es capaz de entrar en las células osteoblásticas MC3T3-E1 (Guo et al., 2007) a través de un mecanismo desconocido, aunque sugieren que el carácter básico de PP-LOX podría facilitar su entrada al interior celular a través de la membrana.

La primera conclusión a la que podemos llegar con el empleo de los sistemas modelo descritos, es que la expresión de LOX, y en mayor medida la de PP-LOX, producen una disminución de la proliferación celular, mientras que la expresión de LOXenz da lugar al efecto contrario. Estos resultados indican que el efecto de PP-LOX sobre la proliferación celular es dominante respecto al efecto de LOXenz, ya que al expresar LOX, la proteína se procesa dando

lugar tanto a PP-LOX como a LOXenz, y sin embargo la presencia de LOX en la célula produce un efecto en la proliferación celular en la misma dirección al que se obtiene cuando expresamos PP-LOX, si bien la reducción del crecimiento celular es mas leve. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos realizados en otras líneas celulares (Giampuzzi et al., 2001; Giampuzzi et al., 2003a; Hurtado et al., 2008; Min et al., 2007; Palamakumbura et al., 2004; Palamakumbura et al., 2009; Wu et al., 2007).

Analizamos si los efectos sobre la proliferación celular de las distintas regiones de LOX se deben a alteraciones en el ciclo celular, y observamos que la sobreexpresión de LOX y de PP-LOX provoca una acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular y en consecuencia una disminución de la proliferación celular. Este mismo efecto de PP-LOX sobre la progresión del ciclo celular fue observado en fibroblastos transformados de ratón por el grupo de Palamakumbura (Palamakumbura et al., 2004). Por el contrario, la sobreexpresión de LOXenz provoca una acumulación de células en fase G2/M, lo que podría explicar el aumento en la proliferación observado en presencia de LOXenz.

Los estudios de formación de focos de crecimiento en agar vienen también a corroborar los resultados anteriores en relación al papel de las distintas regiones de LOX en la proliferación de las células de Ewing. Así, la sobreexpresión de PP-LOX produjo una reducción significativa tanto en el número de colonias creciendo en medio semisólido como en su tamaño medio. Los resultados son similares en el caso de LOX, pero con efectos menos llamativos. De nuevo, LOXenz produce un incremento significativo especialmente en el número de colonias, lo que concuerda con lo obtenido en los estudios de proliferación y ciclo celular. Por tanto, comprobamos que la expresión de PP-LOX y de LOX en las células de Ewing tiene un efecto inhibitorio, tanto de su proliferación como de su capacidad transformante propiamente dicha (capacidad de crecer independientemente de anclaje).

Los resultados obtenidos en los ensayos de migración muestran que tanto LOX como PP-LOX disminuyen la haptotaxis mediada por suero en las células de Ewing A673, mientras que la expresión de LOXenz la aumenta, lo que sugiere de nuevo que el efecto de PP-LOX es dominante frente a LOXenz. Así mismo, el grupo de Zhao y colaboradores mostraron que PP-LOX reduce la migración celular mediada por fibronectina de las líneas de cáncer de mama altamente invasivas, interfiriendo en la activación de la vía de señalización FAK/Src y de su complejo diana p130^{Cas}/Crk/DOCK180, y que el tratamiento de estas células con PP-LOX recombinante atenuaba el aumento de la haptotaxis mediado por LOXenz, por lo que sugieren que PP-LOX podría regular la actividad como promotor tumoral de LOXenz (Zhao et al., 2009). La actividad de LOX conduce a un incremento en la actividad de Rac y Cdc42 y a una

disminución de la actividad de Rho, cambios que corresponden a un fenotipo móvil (Payne et al., 2006). Anteriormente ya se había demostrado que LOX regula la migración de las células de cáncer de mama a través de cambios en la formación de adhesiones entre la célula y la matriz extracelular (Payne et al., 2005) y que estos cambios son el resultado de un mecanismo mediado por el peróxido de hidrógeno liberado en la reacción enzimática de LOXenz y que implica la vía de señalización FAK/Src.

Por otro lado, a pesar de la baja eficiencia de desarrollo de tumores, nuestros datos indican que la expresión de PP-LOX inhibe la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos. El efecto de la expresión de PP-LOX sobre el crecimiento tumoral ha sido bien establecido en otro estudio (Min et al., 2007), en el que los autores observaron que la expresión de PP-LOX suprimía el crecimiento de los tumores inducidos por *Her-2/neu* en un modelo de xenotransplantes, con una reducción de más del 60% en el tamaño de los tumores. Lo interesante de nuestro trabajo es la observación de que una vez desarrollado el tumor, PP-LOX ralentiza el crecimiento del mismo. Estos resultados indican que PP-LOX desempeña un papel importante en el crecimiento de los tumores de Ewing.

Mecanismo de acción de PP-LOX.

El mecanismo molecular de cómo ejerce LOX su actividad supresora de tumores todavía no está claro, si bien a lo largo de los últimos años se han propuesto diferentes mecanismos de acción. Hay datos que indican que PP-LOX inhibe las vías de PI3K/AKT y ERK1/2 MAPK, y por tanto los genes NF/κB y ciclina D1 en células de cáncer de mama transformadas con *Her2/neu* (Min et al., 2007). En líneas celulares de cáncer de páncreas y de pulmón se obtuvieron resultados similares, con la identificación de BCL-2 como uno de los posibles genes adicionalmente regulados por PP-LOX (Wu et al., 2007). Así mismo, se ha visto que PP-LOX inhibe la señalización mediada por integrinas a través de FAK y p130^{Cas}, además de la haptotaxis mediada por fibronectina, en células de cáncer de mama (Zhao et al., 2009). Otros trabajos muestran que PP-LOX inhibe la señalización inducida por FGF-2 en células de cáncer de próstata, interfiriendo con la unión a su receptor y que por tanto inhibe la activación de ERK1/2 y Akt (Jeay et al., 2003; Palamakumbura et al., 2009). Por lo tanto, decidimos analizar el efecto de la expresión de las distintas regiones de LOX sobre la activación de ERK y de Akt en las células de Ewing. Observamos que ninguna de las regiones de LOX tenía efecto sobre la activación de Akt, sin embargo tanto LOX como PP-LOX, disminuían la actividad de ERK. Por el contrario, LOXenz incrementa los niveles de ERK fosforilado. Estos resultados podrían explicar el efecto observado a nivel de proliferación en las células de Ewing. De hecho, la regulación de la vía de señalización de ERK por parte de LOX y PP-LOX es temprana, ya

que a las 12 horas tras la expresión de ambas formas de LOX ya se observa una inhibición de un 80 y un 87% respectivamente en la activación de ERK.

La implicación de las vías de señalización de IGF-1 y de FGF-2 en el mecanismo de acción de LOX y PP-LOX podría explicar el efecto observado sobre la activación de ERK, ya que la unión de los factores de crecimiento a sus receptores da lugar a la autofosforilación y activación de los mismos (Nugent and Iozzo, 2000), conduciendo finalmente a la transducción de señal a través de múltiples vías de señalización, entre las que se encuentra la ruta de MEK/ERK (Eswarakumar et al., 2005; Mohammadi et al., 1991; Weber and Gioeli, 2004). Anteriormente hemos indicado que en las células de Ewing la expresión de LOX está reprimida por FGF-2, de modo que si se demostrase que a su vez LOX reprime la vía de FGF-2 en dichas células, impidiendo su unión al receptor como ocurre en células de cáncer de próstata (Palamakumbura et al., 2009), se trataría de un proceso de retroalimentación negativa.

Los resultados mostrados por diversos grupos apoyan la idea de que LOX puede actuar por más de un mecanismo para alterar las respuestas de crecimiento, migración y muerte de las células cancerígenas, y precisamente en esta habilidad para trabajar a través de múltiples mecanismos de acción podría residir la efectividad de LOX como supresor tumoral. Estudios futuros permitirán determinar con más exactitud los mecanismos por los que LOX regula las vías de señalización que son funcionalmente importantes en la determinación del fenotipo celular.

¿Podría PP-LOX ser una nueva diana terapéutica en los tumores de Ewing?

De los resultados presentados en esta Tesis podemos concluir que: i) LOX no se expresa o se expresa a bajos niveles en los tumores y líneas celulares de Ewing, ii) LOX es un gen diana de EWS/FLI1, iii) IGF-1 y FGF-2 reprimen la expresión de LOX en las células de Ewing y iv) LOX completo y su región propéptido reducen las propiedades transformantes de las células de Ewing. Todo ello indica que LOX desempeña un papel importante en la oncogénesis de los tumores de Ewing y por tanto, el aumento de su expresión y/o actividad puede representar nuevos abordajes terapéuticos en los tumores de la familia Ewing.

Una de las estrategias terapéuticas podría consistir en aumentar la expresión de LOX, para lo que resultaría útil el empleo de suramin, ya que hemos visto que provoca un aumento en los niveles de ARN mensajero de LOX en las células de Ewing, disminuyendo su viabilidad (datos no mostrados). A pesar de que el suramin se introdujo inicialmente para el tratamiento de infecciones parasitarias (Hawking, 1978), su actividad anticancerígena se identificó más tarde, y

en la actualidad se ha introducido en ensayos clínicos para cáncer adrenal, de pulmón y próstata (Garcia-Schurmann et al., 1999; La Rocca et al., 1990a; La Rocca et al., 1990b; Small et al., 2000; Song et al., 2001). Debido a la actividad supresora de la región propéptido de la Lisil Oxidasa, los efectos beneficiosos del suramin en diferentes formas de cáncer podrían ser en parte debidos al aumento de la expresión de LOX (Davol et al., 1999; Mirza et al., 1997; Nellaiappan et al., 2000). Aunque debemos tener en cuenta que el suramin, al aumentar la expresión de LOX, está aumentando tanto la expresión de PP-LOX como la de LOXenz, y que por tanto podría dar lugar a diversos efectos secundarios causados por el aumento de la actividad de LOXenz. De este modo, la enzima madura LOX podría causar fibrosis en diversos órganos como hígado, pulmón, miocardio y riñones, ya que la inducción de LOX parece ser una característica general observada en los procesos fibróticos de estos órganos (Desmouliere et al., 1997; Di Donato et al., 1997; Sivakumar et al., 2008; Tzortzaki et al., 2003). También se ha observado un aumento en la expresión y actividad de LOX en modelos animales de enfermedades degenerativas como esclerosis amiotrófica lateral e incluso en muestras de pacientes con demencia dependiente o independiente de Alzheimer (Gilad and Gilad, 2001; Gilad et al., 2005; Li et al., 2004). Y no debemos olvidar el papel de LOXenz como promotor de metástasis, si bien en las líneas celulares derivadas de los tumores de Ewing, el efecto oncosupresor de PP-LOX parece ser dominante frente a LOXenz. Una estrategia para evitar los efectos secundarios causados por LOXenz podría consistir en un tratamiento combinado de suramin y β -aminopropionitrilo, que inhibiera la actividad de LOX enz.

Otra de las estrategias terapéuticas podría basarse en la expresión ectópica de PP-LOX. En esta Tesis hemos mostrado que es posible expresar PP-LOX mediante el uso de un modelo inducible de sobreexpresión de ADNc. Otro estudio también ha mostrado que esta técnica es eficaz a la hora de aumentar la expresión de PP-LOX *in vivo* en modelos animales (Min et al., 2007). Sin embargo, estas técnicas de expresión ectópica resultan en la actualidad inviables para la práctica clínica y sería necesario el desarrollo de vectores macromoleculares que facilitasen el transporte específico de los ADNc a sus tejidos diana.

Otra alternativa consistiría en la administración de PP-LOX recombinante o bien de un polipéptido mimético de PP-LOX sintetizado químicamente. Como en toda terapia, el aumento de la actividad de PP-LOX puede tener también efectos indeseados. Dado que los trastornos patológicos asociados con las alteraciones de LOX podrían ser causados también por un aumento de la actividad de PP-LOX, debe tenerse en cuenta que las aproximaciones terapéuticas frente a una enfermedad específica, como los tumores de Ewing, podrían afectar negativamente a la fisiología de otros tejidos y órganos. Por lo tanto, los fármacos órgano-específicos podrían ser de elevado interés en esta área. En cualquier caso, de ser efectiva la terapia antitumoral

basada en el aumento de la expresión del supresor tumoral PP-LOX, es probable que las ventajas derivadas de la misma superasen a los efectos secundarios previstos.

Por otro lado, es muy probable que en las células de Ewing, PP-LOX esté interaccionando con otros factores de crecimiento y que estas interacciones sean imprescindibles para llevar a cabo su función. Estudios de predicción de estructura indican que la región propéptido de LOX se ensambla como una proteína intrínsecamente desordenada, y cuando este tipo de proteínas se unen a otras, las proteínas unidas confieren estructura y actividad biológica a las proteínas desordenadas (Min et al., 2007; Vora et al., 2010a). En este sentido, la caracterización de dichas interacciones macromoleculares puede resultar clave en el diseño de estrategias terapéuticas que las favorezcan y de esta manera fomentar la función de PP-LOX en los tumores de Ewing.

6. Conclusiones

1. **La oncoproteína EWS/FLI1, característica de los tumores de la familia Ewing, reprime la expresión de la enzima lisil oxidasa (LOX).** Utilizando sistemas celulares modelo de ARN de interferencia inducible hemos demostrado que EWS/FLI1 reprime la expresión de LOX en las células de tumor de Ewing A673.
2. **IGF-1 y FGF-2 inhiben la expresión de LOX en las células de Ewing.** El suramin aumenta la expresión de LOX en las células de Ewing. Este aumento es revertido por IGF-1 y FGF-2.
3. **LOX, PP-LOX y LOXenz muestran diferentes preferencias en su localización subcelular.** En el interior de las células de Ewing A673, LOX se localiza en el citoplasma mientras que la enzima madura (LOXenz) se trasloca preferentemente al núcleo. El propéptido de LOX (PP-LOX), una vez secretado, permanece en el espacio extracelular.
4. **PP-LOX desempeña un papel central en el control de la proliferación y las características tumorogénicas de las células de Ewing.** La expresión de PP-LOX provoca un arresto en la fase G1 del ciclo celular, disminuye la proliferación y migración celular, y reduce la capacidad para formar tumores en ratones inmunodeprimidos. Todo ello indica que una parte importante de los efectos producidos por EWS/FLI1 en las células de Ewing se deben a la represión de LOX.
5. **PP-LOX y LOXenz tienen funciones inversas en las células de Ewing.** La sobreexpresión de la región propéptido de LOX disminuye las propiedades transformantes de las células de Ewing (proliferación y migración celular, crecimiento independiente de anclaje) mientras que la enzima madura las aumenta.
6. **PP-LOX inhibe la vía de señalización de ERK1/2 MAPK en las células de Ewing.** La expresión de PP-LOX en las células de Ewing disminuye la activación de ERK, lo que explica su efecto a nivel de proliferación celular.

7. Bibliografía

- Abe, S., Funato, T., Takahashi, S., Yokoyama, H., Yamamoto, J., Tomiya, Y., Yamada-Fujiwara, M., Ishizawa, K., Kameoka, J., Kaku, M., *et al.* (2006). Increased expression of insulin-like growth factor I is associated with Ara-C resistance in leukemia. *Tohoku J Exp Med* 209, 217-228.
- Ahmed, A., Gilbert-Barness, E., and Lacson, A. (2004). Expression of c-kit in Ewing family of tumors: a comparison of different immunohistochemical protocols. *Pediatr Dev Pathol* 7, 342-347.
- Albinger-Hegy, A., Stoeckli, S. J., Schmid, S., Storz, M., Iotzova, G., Probst-Hensch, N. M., Rehrauer, H., Tinguely, M., Moch, H., and Hegyi, I. (2010). Lysyl oxidase expression is an independent marker of prognosis and a predictor of lymph node metastasis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC). *Int J Cancer* 126, 2653-2662.
- Armengol, G., Tarkkanen, M., Virolainen, M., Forus, A., Valle, J., Bohling, T., Asko-Seljavaara, S., Blomqvist, C., Elomaa, I., Karaharju, E., *et al.* (1997). Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 75, 1403-1409.
- Arvand, A., Welford, S. M., Teitell, M. A., and Denny, C. T. (2001). The COOH-terminal domain of FLI-1 is necessary for full tumorigenesis and transcriptional modulation by EWS/FLI-1. *Cancer Res* 61, 5311-5317.
- Askin, F. B., Rosai, J., Sibley, R. K., Dehner, L. P., and McAlister, W. H. (1979). Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer* 43, 2438-2451.
- Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Dubousset, J., and Mazabraud, A. (1983). [Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma]. *C R Seances Acad Sci III* 296, 1105-1107.
- Aurias, A., Rimbaut, C., Buffe, D., Zucker, J. M., and Mazabraud, A. (1984). Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 12, 21-25.
- Baccarani-Contri, M., Vincenzi, D., Quaglino, D., Jr., Mori, G., and Pasquali-Ronchetti, I. (1989). Localization of human placenta lysyl oxidase on human placenta, skin and aorta by immunoelectronmicroscopy. *Matrix* 9, 428-436.
- Baer, C., Nees, M., Breit, S., Selle, B., Kulozik, A. E., Schaefer, K. L., Braun, Y., Wai, D., and Poremba, C. (2004). Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 110, 687-694.
- Bailly, R. A., Bosselut, R., Zucman, J., Cormier, F., Delattre, O., Roussel, M., Thomas, G., and Ghysdael, J. (1994). DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* 14, 3230-3241.
- Benini, S., Manara, M. C., Baldini, N., Cerisano, V., Massimo, S., Mercuri, M., Lollini, P. L., Nanni, P., Picci, P., and Scotlandi, K. (2001). Inhibition of insulin-like growth factor I receptor increases the antitumor activity of doxorubicin and vincristine against Ewing's sarcoma cells. *Clin Cancer Res* 7, 1790-1797.
- Bonomi, P. D. (2010). Implications of key trials in advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 116, 1155-1164.

- Braun, B. S., Frieden, R., Lessnick, S. L., May, W. A., and Denny, C. T. (1995). Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Mol Cell Biol* 15, 4623-4630.
- Burdach, S., Plehm, S., Unland, R., Dirksen, U., Borkhardt, A., Staeger, M. S., Muller-Tidow, C., and Richter, G. H. (2009). Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2. *Cell Cycle* 8, 1991-1996.
- Carrillo, J., Agra, N., Fernandez, N., Pestana, A., and Alonso, J. (2009). Devazepide, a nonpeptide antagonist of CCK receptors, induces apoptosis and inhibits Ewing tumor growth. *Anticancer Drugs* 20, 527-533.
- Carrillo, J., Garcia-Aragoncillo, E., Azorin, D., Agra, N., Sastre, A., Gonzalez-Mediero, I., Garcia-Miguel, P., Pestana, A., Gallego, S., Segura, D., and Alonso, J. (2007). Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. *Clin Cancer Res* 13, 2429-2440.
- Cavazzana, A. O., Miser, J. S., Jefferson, J., and Triche, T. J. (1987). Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 127, 507-518.
- Collins, T. S., and Hurwitz, H. I. (2005). Targeting vascular endothelial growth factor and angiogenesis for the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol* 32, 61-68.
- Contente, S., Kenyon, K., Rimoldi, D., and Friedman, R. M. (1990). Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. *Science* 249, 796-798.
- Csiszar, K., Fong, S. F., Ujfalusi, A., Krawetz, S. A., Salvati, E. P., Mackenzie, J. W., and Boyd, C. D. (2002). Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. *Int J Cancer* 97, 636-642.
- Cho, K. R., and Vogelstein, B. (1992). Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl* 16G, 137-141.
- Davol, P. A., Garza, S., and Frackelton, A. R., Jr. (1999). Combining suramin and a chimeric toxin directed to basic fibroblast growth factor receptors increases therapeutic efficacy against human melanoma in an animal model. *Cancer* 86, 1733-1741.
- de Alava, E., Kawai, A., Healey, J. H., Fligman, I., Meyers, P. A., Huvo, A. G., Gerald, W. L., Jhanwar, S. C., Argani, P., Antonescu, C. R., *et al.* (1998). EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 16, 1248-1255.
- Delattre, O., Zucman, J., Melot, T., Garau, X. S., Zucker, J. M., Lenoir, G. M., Ambros, P. F., Sheer, D., Turc-Carel, C., Triche, T. J., and *et al.* (1994). The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 331, 294-299.
- Deneen, B., and Denny, C. T. (2001). Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS/FLI1 mediated transformation. *Oncogene* 20, 6731-6741.
- Deneen, B., Hamidi, H., and Denny, C. T. (2003). Functional analysis of the EWS/ETS target gene uridine phosphorylase. *Cancer Res* 63, 4268-4274.
- Desmouliere, A., Darby, I., Costa, A. M., Raccurt, M., Tuchweber, B., Sommer, P., and Gabbiani, G. (1997). Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and

myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 76, 765-778.

Di Donato, A., Ghiggeri, G. M., Di Duca, M., Jivotenko, E., Acinni, R., Campolo, J., Ginevri, F., and Gusmano, R. (1997). Lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during chronic adriamycin nephropathy. *Nephron* 76, 192-200.

Eliazer, S., Spencer, J., Ye, D., Olson, E., and Ilaria, R. L., Jr. (2003). Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FLI-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma. *Mol Cell Biol* 23, 482-492.

Enneking, W. F., Springfield, D., and Gross, M. (1985). The surgical treatment of parosteal osteosarcoma in long bones. *J Bone Joint Surg Am* 67, 125-135.

Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q. T., Chi, J. T., Jeffrey, S. S., and Giaccia, A. J. (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 440, 1222-1226.

Erler, J. T., and Giaccia, A. J. (2006). Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res* 66, 10238-10241.

Eswarakumar, V. P., Lax, I., and Schlessinger, J. (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 139-149.

Ewing, J. (1921). Diffuse endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc* 21, 17-24.

Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2, 795-803.

Flick, D. A., and Gifford, G. E. (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68, 167-175.

Folpe, A. L., Hill, C. E., Parham, D. M., O'Shea, P. A., and Weiss, S. W. (2000). Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Am J Surg Pathol* 24, 1657-1662.

Gangwal, K., Sankar, S., Hollenhorst, P. C., Kinsey, M., Haroldsen, S. C., Shah, A. A., Boucher, K. M., Watkins, W. S., Jorde, L. B., Graves, B. J., and Lessnick, S. L. (2008). Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10149-10154.

Garcia-Aragoncillo, E., Carrillo, J., Lalli, E., Agra, N., Gomez-Lopez, G., Pestana, A., and Alonso, J. (2008). DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. *Oncogene* 27, 6034-6043.

Garcia-Schurmann, J. M., Schulze, H., Haupt, G., Pastor, J., Allolio, B., and Senge, T. (1999). Suramin treatment in hormone- and chemotherapy-refractory prostate cancer. *Urology* 53, 535-541.

Giampuzzi, M., Botti, G., Cilli, M., Gusmano, R., Borel, A., Sommer, P., and Di Donato, A. (2001). Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene. *J Biol Chem* 276, 29226-29232.

- Giampuzzi, M., Botti, G., Di Duca, M., Arata, L., Ghiggeri, G., Gusmano, R., Ravazzolo, R., and Di Donato, A. (2000). Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagen III promoter. Possible involvement of Ku antigen. *J Biol Chem* 275, 36341-36349.
- Giampuzzi, M., Oleggini, R., Albanese, C., Pestell, R., and Di Donato, A. (2005). beta-catenin signaling and regulation of cyclin D1 promoter in NRK-49F cells transformed by down-regulation of the tumor suppressor lysyl oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1745, 370-381.
- Giampuzzi, M., Oleggini, R., and Di Donato, A. (2003a). Altered adhesion features and signal transduction in NRK-49F cells transformed by down-regulation of lysyl oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1647, 239-244.
- Giampuzzi, M., Oleggini, R., and Di Donato, A. (2003b). Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim Biophys Acta* 1647, 245-251.
- Gilad, G. M., and Gilad, V. H. (2001). Beta-aminopropionitrile treatment can accelerate recovery of mice after spinal cord injury. *Eur J Pharmacol* 430, 69-72.
- Gilad, G. M., Kagan, H. M., and Gilad, V. H. (2005). Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 376, 210-214.
- Ginsberg, J. P., de Alava, E., Ladanyi, M., Wexler, L. H., Kovar, H., Paulussen, M., Zoubek, A., Dockhorn-Dworniczak, B., Juergens, H., Wunder, J. S., *et al.* (1999). EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 17, 1809-1814.
- Goodman, V. L., Brewer, G. J., and Merajver, S. D. (2005). Control of copper status for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 5, 543-549.
- Grier, H. E. (1997). The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am* 44, 991-1004.
- Guan, H., Zhou, Z., Wang, H., Jia, S. F., Liu, W., and Kleinerman, E. S. (2005). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res* 11, 2662-2669.
- Guillon, N., Tirode, F., Boeva, V., Zynovyev, A., Barillot, E., and Delattre, O. (2009). The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS One* 4, e4932.
- Guo, Y., Pischon, N., Palamakumbura, A. H., and Trackman, P. C. (2007). Intracellular distribution of the lysyl oxidase propeptide in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C2095-2102.
- Hajnal, A., Klemen, R., and Schafer, R. (1993). Up-regulation of lysyl oxidase in spontaneous revertants of H-ras-transformed rat fibroblasts. *Cancer Res* 53, 4670-4675.
- Hamalainen, E. R., Kemppainen, R., Kuivaniemi, H., Tromp, G., Vaheri, A., Pihlajaniemi, T., and Kivirikko, K. I. (1995). Quantitative polymerase chain reaction of lysyl oxidase mRNA in malignant transformed human cell lines demonstrates that their low lysyl oxidase activity is due to low quantities of its mRNA and low levels of transcription of the respective gene. *J Biol Chem* 270, 21590-21593.

- Hamalainen, E. R., Kempainen, R., Pihlajaniemi, T., and Kivirikko, K. I. (1993). Structure of the human lysyl oxidase gene. *Genomics* 17, 544-548.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hattinger, C. M., Rumpler, S., Strehl, S., Ambros, I. M., Zoubek, A., Potschger, U., Gadner, H., and Ambros, P. F. (1999). Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 24, 243-254.
- Hattinger, C. M., Zoubek, A., and Ambros, P. F. (2000). Molecular Cytogenetics in Ewing Tumors: Diagnostic and Prognostic Information. *Onkologie* 23, 416-422.
- Hawking, F. (1978). Suramin: with special reference to onchocerciasis. *Adv Pharmacol Chemother* 15, 289-322.
- Hayashi, K., Fong, K. S., Mercier, F., Boyd, C. D., Csiszar, K., and Hayashi, M. (2004). Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *J Mol Histol* 35, 845-855.
- Hendershot, E. (2005). Treatment approaches for metastatic Ewing's sarcoma: a review of the literature. *J Pediatr Oncol Nurs* 22, 339-352.
- Hibshoosh, H., and Lattes, R. (1997). Immunohistochemical and molecular genetic approaches to soft tissue tumor diagnosis: a primer. *Semin Oncol* 24, 515-525.
- Higgins, D. F., Kimura, K., Bernhardt, W. M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R. S., Kretzler, M., Cohen, C. D., *et al.* (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117, 3810-3820.
- Hornstra, I. K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A. J., Mecham, R. P., and Shapiro, S. D. (2003). Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem* 278, 14387-14393.
- Hotfilder, M., Sondermann, P., Senss, A., van Valen, F., Jurgens, H., and Vormoor, J. (2005). PI3K/AKT is involved in mediating survival signals that rescue Ewing tumour cells from fibroblast growth factor 2-induced cell death. *Br J Cancer* 92, 705-710.
- Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E., and Triche, T. J. (2005a). Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 65, 8984-8992.
- Hu-Lieskovan, S., Zhang, J., Wu, L., Shimada, H., Schofield, D. E., and Triche, T. J. (2005b). EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res* 65, 4633-4644.
- Huang, G., Zhang, Y., Kim, B., Ge, G., Annis, D. S., Mosher, D. F., and Greenspan, D. S. (2009). Fibronectin binds and enhances the activity of bone morphogenetic protein 1. *J Biol Chem* 284, 25879-25888.
- Hurtado, P. A., Vora, S., Sume, S. S., Yang, D., St Hilaire, C., Guo, Y., Palamakumbura, A. H., Schreiber, B. M., Ravid, K., and Trackman, P. C. (2008). Lysyl oxidase propeptide inhibits smooth muscle cell signaling and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 156-161.

- Jaishankar, S., Zhang, J., Roussel, M. F., and Baker, S. J. (1999). Transforming activity of EWS/FLI is not strictly dependent upon DNA-binding activity. *Oncogene* 18, 5592-5597.
- Janknecht, R. (2005). EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 363, 1-14.
- Jeay, S., Pianetti, S., Kagan, H. M., and Sonenshein, G. E. (2003). Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 23, 2251-2263.
- Jeon, I. S., Davis, J. N., Braun, B. S., Sublett, J. E., Roussel, M. F., Denny, C. T., and Shapiro, D. N. (1995). A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 10, 1229-1234.
- Kagan, H. M. (1994). Lysyl oxidase: mechanism, regulation and relationship to liver fibrosis. *Pathol Res Pract* 190, 910-919.
- Kagan, H. M., and Li, W. (2003). Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* 88, 660-672.
- Kagan, H. M., Reddy, V. B., Panchenko, M. V., Nagan, N., Boak, A. M., Gacheru, S. N., and Thomas, K. M. (1995). Expression of lysyl oxidase from cDNA constructs in mammalian cells: the propeptide region is not essential to the folding and secretion of the functional enzyme. *J Cell Biochem* 59, 329-338.
- Kagan, H. M., Vaccaro, C. A., Bronson, R. E., Tang, S. S., and Brody, J. S. (1986). Ultrastructural immunolocalization of lysyl oxidase in vascular connective tissue. *J Cell Biol* 103, 1121-1128.
- Kagan, H. M., Williams, M. A., Calaman, S. D., and Berkowitz, E. M. (1983). Histone H1 is a substrate for lysyl oxidase and contains endogenous sodium borotritide-reducible residues. *Biochem Biophys Res Commun* 115, 186-192.
- Kaneda, A., Wakazono, K., Tsukamoto, T., Watanabe, N., Yagi, Y., Tatematsu, M., Kaminishi, M., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2004). Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res* 64, 6410-6415.
- Kaneko, Y., Yoshida, K., Handa, M., Toyoda, Y., Nishihira, H., Tanaka, Y., Sasaki, Y., Ishida, S., Higashino, F., and Fujinaga, K. (1996). Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 15, 115-121.
- Karnieli, E., Werner, H., Rauscher, F. J., 3rd, Benjamin, L. E., and LeRoith, D. (1996). The IGF-I receptor gene promoter is a molecular target for the Ewing's sarcoma-Wilms' tumor 1 fusion protein. *J Biol Chem* 271, 19304-19309.
- Kauer, M., Ban, J., Kofler, R., Walker, B., Davis, S., Meltzer, P., and Kovar, H. (2009). A molecular function map of Ewing's sarcoma. *PLoS One* 4, e5415.
- Kennedy, J. G., Frelinghuysen, P., and Hoang, B. H. (2003). Ewing sarcoma: current concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Pediatr* 15, 53-57.
- Kenyon, K., Contente, S., Trackman, P. C., Tang, J., Kagan, H. M., and Friedman, R. M. (1991). Lysyl oxidase and rrg messenger RNA. *Science* 253, 802.

- Kim, G. E., Beach, B., Gastier-Foster, J. M., Murata-Collins, J. L., Rowland, J. M., O'Donnell, R. J., and Goldsby, R. E. (2005). Ewing sarcoma as a second malignant neoplasm after acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 45, 57-59.
- Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Fong, S. F., Nieva, D. R., Sullivan, C. M., Edwards, E. M., Sommer, P., Csiszar, K., and Hendrix, M. J. (2002). A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res* 62, 4478-4483.
- Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Nieva, D. R., Mariano, E. A., and Hendrix, M. J. (1999). Differentially expressed genes associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 55, 127-136.
- Kolb, E. A., Gorlick, R., Houghton, P. J., Morton, C. L., Lock, R., Carol, H., Reynolds, C. P., Maris, J. M., Keir, S. T., Billups, C. A., and Smith, M. A. (2008). Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the IGF-1 receptor by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 50, 1190-1197.
- Kovar, H. (1998). Progress in the molecular biology of ewing tumors. *Sarcoma* 2, 3-17.
- Kovar, H., Aryee, D. N., Jug, G., Henockl, C., Schemper, M., Delattre, O., Thomas, G., and Gadner, H. (1996). EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 7, 429-437.
- Kovar, H., Dworzak, M., Strehl, S., Schnell, E., Ambros, I. M., Ambros, P. F., and Gadner, H. (1990). Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* 5, 1067-1070.
- Kovar, H., Jug, G., Aryee, D. N., Zoubek, A., Ambros, P., Gruber, B., Windhager, R., and Gadner, H. (1997). Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 15, 2225-2232.
- Krawetz, S. A. (1994). The origin of lysyl oxidase. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 108, 117-119.
- Kuivaniemi, H., Ala-Kokko, L., and Kivirikko, K. I. (1986). Secretion of lysyl oxidase by cultured human skin fibroblasts and effects of monensin, nigericin, tunicamycin and colchicine. *Biochim Biophys Acta* 883, 326-334.
- La Rocca, R. V., Stein, C. A., Danesi, R., and Myers, C. E. (1990a). Suramin, a novel antitumor compound. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 893-898.
- La Rocca, R. V., Stein, C. A., and Myers, C. E. (1990b). Suramin: prototype of a new generation of antitumor compounds. *Cancer Cells* 2, 106-115.
- Lambert, G., Bertrand, J. R., Fattal, E., Subra, F., Pinto-Alphandary, H., Malvy, C., Auclair, C., and Couvreur, P. (2000). EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 401-406.
- Lawrence, J. B., Conover, C. A., Haddad, T. C., Ingle, J. N., Reid, J. M., Ames, M. M., Suman, V. J., Marks, R. S., Erlichman, C., and Hartmann, L. C. (1997). Evaluation of continuous infusion suramin in metastatic breast cancer: impact on plasma levels of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins. *Clin Cancer Res* 3, 1713-1720.

- Lazarus, H. M., Cruikshank, W. W., Narasimhan, N., Kagan, H. M., and Center, D. M. (1995). Induction of human monocyte motility by lysyl oxidase. *Matrix Biol* 14, 727-731.
- Le Deley, M. C., Delattre, O., Schaefer, K. L., Burchill, S. A., Koehler, G., Hogendoorn, P. C., Lion, T., Poremba, C., Marandet, J., Ballet, S., *et al.* (2010). Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 28, 1982-1988.
- Leavey, P. J., and Collier, A. B. (2008). Ewing sarcoma: prognostic criteria, outcomes and future treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 617-624.
- Lessnick, S. L., Braun, B. S., Denny, C. T., and May, W. A. (1995). Multiple domains mediate transformation by the Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene. *Oncogene* 10, 423-431.
- Lessnick, S. L., Dacwag, C. S., and Golub, T. R. (2002). The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 1, 393-401.
- Li, P. A., He, Q., Cao, T., Yong, G., Szauder, K. M., Fong, K. S., Karlsson, J., Keep, M. F., and Csiszar, K. (2004). Up-regulation and altered distribution of lysyl oxidase in the central nervous system of mutant SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 120, 115-122.
- Li, W., Liu, G., Chou, I. N., and Kagan, H. M. (2000). Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 78, 550-557.
- Li, W., Nellaiappan, K., Strassmaier, T., Graham, L., Thomas, K. M., and Kagan, H. M. (1997). Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12817-12822.
- Linz, R., and Lutsenko, S. (2007). Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *J Bioenerg Biomembr* 39, 403-407.
- Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J. A., Yanagisawa, H., Zuo, J., and Li, T. (2004). Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet* 36, 178-182.
- Lucero, H. A., and Kagan, H. M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 63, 2304-2316.
- Lucero, H. A., Ravid, K., Grimsby, J. L., Rich, C. B., DiCamillo, S. J., Maki, J. M., Myllyharju, J., and Kagan, H. M. (2008). Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 283, 24103-24117.
- Mackintosh, C., Madoz-Gurpide, J., Ordonez, J. L., Osuna, D., and Herrero-Martin, D. (2010). The molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Cancer Biol Ther* 9.
- Maki, J. M., Rasanen, J., Tikkanen, H., Sormunen, R., Makikallio, K., Kivirikko, K. I., and Soininen, R. (2002). Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation* 106, 2503-2509.
- Maki, J. M., Sormunen, R., Lippo, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Soininen, R., and Myllyharju, J. (2005). Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol* 167, 927-936.

- Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B. D., Ye, S. Q., Garcia, J. G., and Semenza, G. L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659-669.
- Manara, M. C., Landuzzi, L., Nanni, P., Nicoletti, G., Zambelli, D., Lollini, P. L., Nanni, C., Hofmann, F., Garcia-Echeverria, C., Picci, P., and Scotlandi, K. (2007). Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor--specific inhibitor in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 13, 1322-1330.
- Mao, X., Miesfeldt, S., Yang, H., Leiden, J. M., and Thompson, C. B. (1994). The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. *J Biol Chem* 269, 18216-18222.
- Martins, A. S., Mackintosh, C., Martin, D. H., Campos, M., Hernandez, T., Ordonez, J. L., and de Alava, E. (2006). Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor. *Clin Cancer Res* 12, 3532-3540.
- Mateo-Lozano, S., Gokhale, P. C., Soldatenkov, V. A., Dritschilo, A., Tirado, O. M., and Notario, V. (2006). Combined transcriptional and translational targeting of EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 12, 6781-6790.
- Mateo-Lozano, S., Tirado, O. M., and Notario, V. (2003). Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* 22, 9282-9287.
- May, W. A., Gishizky, M. L., Lessnick, S. L., Lunsford, L. B., Lewis, B. C., Delattre, O., Zucman, J., Thomas, G., and Denny, C. T. (1993a). Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5752-5756.
- May, W. A., Lessnick, S. L., Braun, B. S., Klemsz, M., Lewis, B. C., Lunsford, L. B., Hromas, R., and Denny, C. T. (1993b). The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 13, 7393-7398.
- Mendiola, M., Carrillo, J., Garcia, E., Lalli, E., Hernandez, T., de Alava, E., Tirode, F., Delattre, O., Garcia-Miguel, P., Lopez-Barea, F., *et al.* (2006). The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. *Int J Cancer* 118, 1381-1389.
- Meyers, P. A., and Levy, A. S. (2000). Ewing's sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 1, 247-257.
- Min, C., Kirsch, K. H., Zhao, Y., Jeay, S., Palamakumbura, A. H., Trackman, P. C., and Sonenshein, G. E. (2007). The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer. *Cancer Res* 67, 1105-1112.
- Min, C., Yu, Z., Kirsch, K. H., Zhao, Y., Vora, S. R., Trackman, P. C., Spicer, D. B., Rosenberg, L., Palmer, J. R., and Sonenshein, G. E. (2009). A loss-of-function polymorphism in the propeptide domain of the LOX gene and breast cancer. *Cancer Res* 69, 6685-6693.
- Minniti, C. P., Maggi, M., and Helman, L. J. (1992). Suramin inhibits the growth of human rhabdomyosarcoma by interrupting the insulin-like growth factor II autocrine growth loop. *Cancer Res* 52, 1830-1835.

- Minniti, G., Muni, R., Lanzetta, G., Marchetti, P., and Enrici, R. M. (2009). Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res* 29, 5171-5184.
- Mirza, M. R., Jakobsen, E., Pfeiffer, P., Lindebjerg-Clasen, B., Bergh, J., and Rose, C. (1997). Suramin in non-small cell lung cancer and advanced breast cancer. Two parallel phase II studies. *Acta Oncol* 36, 171-174.
- Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., and Koutsilieris, M. (2004). The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 235-256.
- Mitsiades, N., Poulaki, V., Leone, A., and Tsokos, M. (1999). Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 91, 1678-1684.
- Miyagawa, Y., Okita, H., Nakaijima, H., Horiuchi, Y., Sato, B., Taguchi, T., Toyoda, M., Katagiri, Y. U., Fujimoto, J., Hata, J., *et al.* (2008). Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol* 28, 2125-2137.
- Mohammadi, M., Honegger, A. M., Rotin, D., Fischer, R., Bellot, F., Li, W., Dionne, C. A., Jaye, M., Rubinstein, M., and Schlessinger, J. (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol* 11, 5068-5078.
- Molnar, J., Fong, K. S., He, Q. P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S. F., Fogelgren, B., Szauder, K. M., Mink, M., and Csiszar, K. (2003). Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta* 1647, 220-224.
- Nellaiappan, K., Risitano, A., Liu, G., Nicklas, G., and Kagan, H. M. (2000). Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Cell Biochem* 79, 576-582.
- Noguera, R., Triche, T. J., Navarro, S., Tsokos, M., and Llombart-Bosch, A. (1992). Dynamic model of differentiation in Ewing's sarcoma cells. Comparative analysis of morphologic, immunocytochemical, and oncogene expression parameters. *Lab Invest* 66, 143-151.
- Nugent, M. A., and Iozzo, R. V. (2000). Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 115-120.
- O'Regan, S., Diebler, M. F., Meunier, F. M., and Vyas, S. (1995). A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron. *J Neurochem* 64, 69-76.
- Oberhuber, H., Seliger, B., and Schafer, R. (1995). Partial restoration of pre-transformation levels of lysyl oxidase and transin mRNAs in phenotypic ras revertants. *Mol Carcinog* 12, 198-204.
- Ohali, A., Avigad, S., Zaizov, R., Ophir, R., Horn-Saban, S., Cohen, I. J., Meller, I., Kollender, Y., Issakov, J., and Yaniv, I. (2004). Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling. *Oncogene* 23, 8997-9006.
- Ohno, T., Rao, V. N., and Reddy, E. S. (1993). EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res* 53, 5859-5863.

- Olmos, D., Postel-Vinay, S., Molife, L. R., Okuno, S. H., Schuetze, S. M., Paccagnella, M. L., Batzel, G. N., Yin, D., Pritchard-Jones, K., Judson, I., *et al.* (2010). Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol* 11, 129-135.
- Ouchida, M., Ohno, T., Fujimura, Y., Rao, V. N., and Reddy, E. S. (1995). Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 11, 1049-1054.
- Owen, L. A., Kowalewski, A. A., and Lessnick, S. L. (2008). EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS One* 3, e1965.
- Owen, L. A., and Lessnick, S. L. (2006). Identification of target genes in their native cellular context: an analysis of EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Cell Cycle* 5, 2049-2053.
- Pal, N. R., Aguan, K., Sharma, A., and Amari, S. (2007). Discovering biomarkers from gene expression data for predicting cancer subgroups using neural networks and relational fuzzy clustering. *BMC Bioinformatics* 8, 5.
- Palamakumbura, A. H., Jeay, S., Guo, Y., Pischon, N., Sommer, P., Sonenshein, G. E., and Trackman, P. C. (2004). The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *J Biol Chem* 279, 40593-40600.
- Palamakumbura, A. H., Sommer, P., and Trackman, P. C. (2003). Autocrine growth factor regulation of lysyl oxidase expression in transformed fibroblasts. *J Biol Chem* 278, 30781-30787.
- Palamakumbura, A. H., Vora, S. R., Nugent, M. A., Kirsch, K. H., Sonenshein, G. E., and Trackman, P. C. (2009). Lysyl oxidase propeptide inhibits prostate cancer cell growth by mechanisms that target FGF-2-cell binding and signaling. *Oncogene* 28, 3390-3400.
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., *et al.* (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241-254.
- Paulussen, M., Frohlich, B., and Jurgens, H. (2001). Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr Drugs* 3, 899-913.
- Payne, S. L., Fogelgren, B., Hess, A. R., Seftor, E. A., Wiley, E. L., Fong, S. F., Csiszar, K., Hendrix, M. J., and Kirschmann, D. A. (2005). Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res* 65, 11429-11436.
- Payne, S. L., Hendrix, M. J., and Kirschmann, D. A. (2006). Lysyl oxidase regulates actin filament formation through the p130(Cas)/Crk/DOCK180 signaling complex. *J Cell Biochem* 98, 827-837.
- Payne, S. L., Hendrix, M. J., and Kirschmann, D. A. (2007). Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem* 101, 1338-1354.
- Perlman, E. J., Dickman, P. S., Askin, F. B., Grier, H. E., Miser, J. S., and Link, M. P. (1994). Ewing's sarcoma--routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. *Hum Pathol* 25, 304-307.

- Peter, M., Couturier, J., Pacquement, H., Michon, J., Thomas, G., Magdelenat, H., and Delattre, O. (1997). A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* 14, 1159-1164.
- Pinnell, S. R., and Martin, G. R. (1968). The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-amino adipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 708-716.
- Postovit, L. M., Abbott, D. E., Payne, S. L., Wheaton, W. W., Margaryan, N. V., Sullivan, R., Jansen, M. K., Csiszar, K., Hendrix, M. J., and Kirschmann, D. A. (2008). Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. *J Cell Biochem* 103, 1369-1378.
- Poulsen, L., Horn, N., Heilstrup, H., Lund, C., Tumer, Z., and Moller, L. B. (2002). X-linked recessive Menkes disease: identification of partial gene deletions in affected males. *Clin Genet* 62, 449-457.
- Prieur, A., Tirode, F., Cohen, P., and Delattre, O. (2004). EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 24, 7275-7283.
- Ravera, F., Miglietta, L., Pirani, P., Ferrini, S., and Favoni, R. E. (1993). Suramin-induced growth inhibition and insulin-like growth factor-I binding blockade in human breast carcinoma cell lines: potentially related events. *Eur J Cancer* 29A, 225-230.
- Ren, C., Yang, G., Timme, T. L., Wheeler, T. M., and Thompson, T. C. (1998). Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer. *Cancer Res* 58, 1285-1290.
- Richter, G. H., Plehm, S., Fasan, A., Rossler, S., Unland, R., Bennani-Baiti, I. M., Hotfilder, M., Lowel, D., von Luettichau, I., Mossbrugger, I., *et al.* (2009). EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5324-5329.
- Riggi, N., Suva, M. L., Suva, D., Cironi, L., Provero, P., Tercier, S., Joseph, J. M., Stehle, J. C., Baumer, K., Kindler, V., and Stamenkovic, I. (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68, 2176-2185.
- Rocchi, A., Manara, M. C., Sciandra, M., Zambelli, D., Nardi, F., Nicoletti, G., Garofalo, C., Meschini, S., Astolfi, A., Colombo, M. P., *et al.* (2010). CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 120, 668-680.
- Rodriguez-Galindo, C., Spunt, S. L., and Pappo, A. S. (2003). Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future. *Med Pediatr Oncol* 40, 276-287.
- Rodriguez, C., Martinez-Gonzalez, J., Raposo, B., Alcudia, J. F., Guadall, A., and Badimon, L. (2008a). Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 79, 7-13.
- Rodriguez, C., Rodriguez-Sinovas, A., and Martinez-Gonzalez, J. (2008b). Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect* 21, 218-224.

- Rorie, C. J., Thomas, V. D., Chen, P., Pierce, H. H., O'Bryan, J. P., and Weissman, B. E. (2004). The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 64, 1266-1277.
- Rucker, R. B., Kosonen, T., Clegg, M. S., Mitchell, A. E., Rucker, B. R., Uriu-Hare, J. Y., and Keen, C. L. (1998). Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr* 67, 996S-1002S.
- Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L., and Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6392-6397.
- Sanceau, J., Hiscott, J., Delattre, O., and Wietzerbin, J. (2000). IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene* 19, 3372-3383.
- Sano, T., Tsujino, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Haruma, K., Ito, H., Nakamura, Y., Kajiyama, G., and Tahara, E. (1991). Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 51, 2926-2931.
- Scotlandi, K. (2006). Targeted therapies in Ewing's sarcoma. *Adv Exp Med Biol* 587, 13-22.
- Scotlandi, K., Avnet, S., Benini, S., Manara, M. C., Serra, M., Cerisano, V., Perdichizzi, S., Lollini, P. L., De Giovanni, C., Landuzzi, L., and Picci, P. (2002a). Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells. *Int J Cancer* 101, 11-16.
- Scotlandi, K., Benini, S., Nanni, P., Lollini, P. L., Nicoletti, G., Landuzzi, L., Serra, M., Manara, M. C., Picci, P., and Baldini, N. (1998). Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res* 58, 4127-4131.
- Scotlandi, K., Maini, C., Manara, M. C., Benini, S., Serra, M., Cerisano, V., Strammiello, R., Baldini, N., Lollini, P. L., Nanni, P., *et al.* (2002b). Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. *Cancer Gene Ther* 9, 296-307.
- Scotlandi, K., Perdichizzi, S., Bernard, G., Nicoletti, G., Nanni, P., Lollini, P. L., Curti, A., Manara, M. C., Benini, S., Bernard, A., and Picci, P. (2006). Targeting CD99 in association with doxorubicin: an effective combined treatment for Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 42, 91-96.
- Scheiffele, P., Peranen, J., and Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378, 96-98.
- Seve, S., Decitre, M., Gleyzal, C., Farjanel, J., Sergeant, A., Ricard-Blum, S., and Sommer, P. (2002). Expression analysis of recombinant lysyl oxidase (LOX) in myofibroblastlike cells. *Connect Tissue Res* 43, 613-619.
- Siligan, C., Ban, J., Bachmaier, R., Spahn, L., Kreppel, M., Schaefer, K. L., Poremba, C., Aryee, D. N., and Kovar, H. (2005). EWS-FLI1 target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin. *Oncogene* 24, 2512-2524.
- Sivakumar, P., Gupta, S., Sarkar, S., and Sen, S. (2008). Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 307, 159-167.

- Small, E. J., Meyer, M., Marshall, M. E., Reyno, L. M., Meyers, F. J., Natale, R. B., Lenehan, P. F., Chen, L., Slichenmyer, W. J., and Eisenberger, M. (2000). Suramin therapy for patients with symptomatic hormone-refractory prostate cancer: results of a randomized phase III trial comparing suramin plus hydrocortisone to placebo plus hydrocortisone. *J Clin Oncol* 18, 1440-1450.
- Smith-Mungo, L. I., and Kagan, H. M. (1998). Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 16, 387-398.
- Smith, R., Owen, L. A., Trem, D. J., Wong, J. S., Whangbo, J. S., Golub, T. R., and Lessnick, S. L. (2006). Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 9, 405-416.
- Song, S., Wientjes, M. G., Walsh, C., and Au, J. L. (2001). Nontoxic doses of suramin enhance activity of paclitaxel against lung metastases. *Cancer Res* 61, 6145-6150.
- Sorensen, P. H., Lessnick, S. L., Lopez-Terrada, D., Liu, X. F., Triche, T. J., and Denny, C. T. (1994). A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* 6, 146-151.
- Staeger, M. S., Hutter, C., Neumann, I., Foja, S., Hattenhorst, U. E., Hansen, G., Afar, D., and Burdach, S. E. (2004). DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64, 8213-8221.
- Stillier, C. A., and Parkin, D. M. (1996). Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br Med Bull* 52, 682-703.
- Stout, AP. (1918). A tumor of the ulnar nerve. *Proc NY Pathol Soc* 12, 2-12.
- Sun, W., Park, K. W., Choe, J., Rhyu, I. J., Kim, I. H., Park, S. K., Choi, B., Choi, S. H., Park, S. H., and Kim, H. (2005). Identification of novel electroconvulsive shock-induced and activity-dependent genes in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 848-856.
- Tamura, G., Sakata, K., Maesawa, C., Suzuki, Y., Terashima, M., Satoh, K., Sekiyama, S., Suzuki, A., Eda, Y., and Satodate, R. (1995). Microsatellite alterations in adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 55, 1933-1936.
- Tanaka, K., Iwakuma, T., Harimaya, K., Sato, H., and Iwamoto, Y. (1997). EWS-Flil antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 99, 239-247.
- Thomassin, L., Werneck, C. C., Broekelmann, T. J., Gleyzal, C., Hornstra, I. K., Mecham, R. P., and Sommer, P. (2005). The Pro-regions of lysyl oxidase and lysyl oxidase-like 1 are required for deposition onto elastic fibers. *J Biol Chem* 280, 42848-42855.
- Thompson, A. D., Teitell, M. A., Arvand, A., and Denny, C. T. (1999). Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene* 18, 5506-5513.
- Tirado, O. M., Mateo-Lozano, S., Villar, J., Dettin, L. E., Lloret, A., Gallego, S., Ban, J., Kovar, H., and Notario, V. (2006). Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res* 66, 9937-9947.

- Tirole, F., Laud-Duval, K., Prieur, A., Delorme, B., Charbord, P., and Delattre, O. (2007). Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11, 421-429.
- Tkaczuk, K. H. (2009). Review of the contemporary cytotoxic and biologic combinations available for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther* 31 Pt 2, 2273-2289.
- Torchia, E. C., Jaishankar, S., and Baker, S. J. (2003). Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res* 63, 3464-3468.
- Toretzky, J. A., Connell, Y., Neckers, L., and Bhat, N. K. (1997). Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 31, 9-16.
- Triche, T. J. (1988). Diagnosis of small round cell tumors of childhood. *Bull Cancer* 75, 297-310.
- Turc-Carel, C., Philip, I., Berger, M. P., Philip, T., and Lenoir, G. (1983). [Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma]. *C R Seances Acad Sci III* 296, 1101-1103.
- Tzortzaki, E. G., Tischfield, J. A., Sahota, A., Siafakas, N. M., Gordon, M. K., and Gerecke, D. R. (2003). Expression of FACIT collagens XII and XIV during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275, 1073-1080.
- Urano, F., Umezawa, A., Hong, W., Kikuchi, H., and Hata, J. (1996). A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 608-612.
- Uzel, M. I., Scott, I. C., Babakhanlou-Chase, H., Palamakumbura, A. H., Pappano, W. N., Hong, H. H., Greenspan, D. S., and Trackman, P. C. (2001). Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem* 276, 22537-22543.
- Uzel, M. I., Shih, S. D., Gross, H., Kessler, E., Gerstenfeld, L. C., and Trackman, P. C. (2000). Molecular events that contribute to lysyl oxidase enzyme activity and insoluble collagen accumulation in osteosarcoma cell clones. *J Bone Miner Res* 15, 1189-1197.
- van Doorninck, J. A., Ji, L., Schaub, B., Shimada, H., Wing, M. R., Krailo, M. D., Lessnick, S. L., Marina, N., Triche, T. J., Spoto, R., *et al.* (2010). Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 28, 1989-1994.
- Vora, S. R., Guo, Y., Stephens, D. N., Salih, E., Vu, E. D., Kirsch, K. H., Sonenshein, G. E., and Trackman, P. C. (2010a). Characterization of recombinant lysyl oxidase propeptide. *Biochemistry* 49, 2962-2972.
- Vora, S. R., Palamakumbura, A. H., Mitsi, M., Guo, Y., Pischon, N., Nugent, M. A., and Trackman, P. C. (2010b). Lysyl oxidase propeptide inhibits FGF-2-induced signaling and proliferation of osteoblasts. *J Biol Chem* 285, 7384-7393.
- Wagner, L. M., Neel, M. D., Pappo, A. S., Merchant, T. E., Poquette, C. A., Rao, B. N., and Rodriguez-Galindo, C. (2001). Fractures in pediatric Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 23, 568-571.

- Wai, D. H., Schaefer, K. L., Schramm, A., Korsching, E., Van Valen, F., Ozaki, T., Boecker, W., Schweigerer, L., Dockhorn-Dworniczak, B., and Poremba, C. (2002). Expression analysis of pediatric solid tumor cell lines using oligonucleotide microarrays. *Int J Oncol* 20, 441-451.
- Weber, M. J., and Gioeli, D. (2004). Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 91, 13-25.
- Welford, S. M., Hebert, S. P., Deneen, B., Arvand, A., and Denny, C. T. (2001). DNA binding domain-independent pathways are involved in EWS/FLI1-mediated oncogenesis. *J Biol Chem* 276, 41977-41984.
- West, D. C. (2000). Ewing sarcoma family of tumors. *Curr Opin Oncol* 12, 323-329.
- West, D. C., Grier, H. E., Swallow, M. M., Demetri, G. D., Granowetter, L., and Sklar, J. (1997). Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *J Clin Oncol* 15, 583-588.
- Widhe, B., and Widhe, T. (2000). Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 82, 667-674.
- Willman, C. L., Sever, C. E., Pallavicini, M. G., Harada, H., Tanaka, N., Slovak, M. L., Yamamoto, H., Harada, K., Meeker, T. C., List, A. F., and et al. (1993). Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science* 259, 968-971.
- Wu, M., Min, C., Wang, X., Yu, Z., Kirsch, K. H., Trackman, P. C., and Sonenshein, G. E. (2007). Repression of BCL2 by the tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide inhibits transformed phenotype of lung and pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 67, 6278-6285.
- Yee, D., Favoni, R. E., Lebovic, G. S., Lombana, F., Powell, D. R., Reynolds, C. P., and Rosen, N. (1990). Insulin-like growth factor I expression by tumors of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor. *J Clin Invest* 86, 1806-1814.
- Yi, H., Fujimura, Y., Ouchida, M., Prasad, D. D., Rao, V. N., and Reddy, E. S. (1997). Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. *Oncogene* 14, 1259-1268.
- Zhang, Y., Song, S., Yang, F., Au, J. L., and Wientjes, M. G. (2001). Nontoxic doses of suramin enhance activity of doxorubicin in prostate tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 426-433.
- Zhao, Y., Min, C., Vora, S. R., Trackman, P. C., Sonenshein, G. E., and Kirsch, K. H. (2009). The lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of focal adhesion kinase and p130Cas in breast cancer cells. *J Biol Chem* 284, 1385-1393.
- Zoubek, A., Dockhorn-Dworniczak, B., Delattre, O., Christiansen, H., Niggli, F., Gatterer-Menz, I., Smith, T. L., Jurgens, H., Gadner, H., and Kovar, H. (1996). Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14, 1245-1251.
- Zoubek, A., Kovar, H., and Gadner, H. (1998). [Cytogenetic and molecular genetic changes in malignant primary bone tumors]. *Radiologe* 38, 467-471.
- Zoubek, A., Pfeleiderer, C., Salzer-Kuntschik, M., Amann, G., Windhager, R., Fink, F. M., Koscielniak, E., Delattre, O., Strehl, S., Ambros, P. F., and et al. (1994). Variability of EWS

chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data. *Br J Cancer* 70, 908-913.

Zucman-Rossi, J., Batzer, M. A., Stoneking, M., Delattre, O., and Thomas, G. (1997). Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. *Hum Genet* 99, 357-363.

Zucman, J., Melot, T., Desmaze, C., Ghysdael, J., Plougastel, B., Peter, M., Zucker, J. M., Triche, T. J., Sheer, D., Turc-Carel, C., and et al. (1993). Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 12, 4481-4487.

Los resultados presentados en esta tesis serán plasmados en un artículo en preparación, titulado:

Lysyl oxidase propeptide is a supressor of Ewing tumorigenesis. Agra N, Alonso J. En preparación.

Además, durante el transcurso de la tesis se han publicado los siguientes artículos en los que el doctorando ha participado:

Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth. Carrillo J, García-Aragoncillo E, Azorín D, Agra N, Sastre A, González-Mediero I, García-Miguel P, Pestaña A, Gallego S, Segura D, Alonso J. Clinical Cancer Research. 2007 Apr 15; 13 (8), 2429-2440.

DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing tumors. García-Aragoncillo E, Carrillo J, Lalli E, Agra N, Gómez-López G, Pestaña A, Alonso J. Oncogene. 2008 Oct 9; 27(46):6034-43.

Devazepide, a nonpeptide antagonist of CCK receptors, induces apoptosis and inhibit Ewing tumor growth. Carrillo J, Agra N, Fernández N, Pestaña A, Alonso J. Anticancer Drugs. 2009 Aug; 20(7):527-33.

The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes β -catenin/TCF-mediated transcription. Navarro D, Agra N, Pestaña A, Alonso J, González-Sancho JM. Carcinogenesis. 2010 Mar; 31(3): 394-401.

